

Université de Montréal

**Caractérisation clinique et génétique d'une nouvelle forme de
dystrophie musculaire avec hyperlaxité**

Par
Martine Tétreault

Programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal
Faculté des études supérieures (FES)

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science (MSc)
en Biologie Moléculaire

Décembre 2005

© Martine Tétreault, 2005



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation clinique et génétique d'une nouvelle forme
de dystrophie musculaire avec hyperlaxité**

Présenté par :

Martine Tétreault

À été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Louise Simard

Président rapporteur

Dr. Bernard Brais

Directeur de recherche

Dr. Michael Sinnreich

Membre du jury

Résumé

Les dystrophies musculaires congénitales sont un groupe de maladie hétérogène caractérisée par de l'hypotonie et de la faiblesse musculaire. Un consortium international a classifié les CMD en cinq groupes différents selon leurs caractéristiques cliniques et moléculaires. La majorité des gènes associés avec une CMD sont des constituants de la matrice extracellulaire ou de la lame basale. À l'intérieur de l'un des groupes on retrouve une CMD avec hyperlaxité, la dystrophie musculaire de Ullrich (UCMD).

L'UCMD est principalement associé à des contractures proximales et de l'hyperlaxité distale. Des mutations dans les trois gènes codant pour les sous unités du collagène VI (A1, A2 et A3) sont responsables de cette maladie. Nous observons de plus en plus une hétérogénéité phénotypique et génétique avec ce phénotype combinant CMD avec hyperlaxité. Dans cette étude, nous décrivons une cohorte de 14 patients canadien-français avec un phénotype modéré de CMD avec hyperlaxité des articulations (CMDH) provenant du sud ouest du Québec. La similarité des caractéristiques cliniques entre les patients CMDH et UCMD nous a obligée à considérer les gènes codant pour le collagène VI comme candidats. Par analyse de liaison et séquençage, nous avons exclu ces loci comme étant responsable du phénotype dans notre cohorte.

Suite à ces résultats, nous avons effectué un criblage entier du génome (densité de 7cM) avec deux des familles pour identifier des loci d'intérêts. Par une analyse des LOD scores avec Genhunter, nous

avons identifié une région sur le chromosome 3 (LOD score 2,5). Suite au criblage fin avec la cohorte en entier, nous avons déterminé un intervalle de 5cM au locus 3p23-21.3 avec un LOD score maximale de 5,3. L'identification de ce nouveau locus démontre la présence d'hétérogénéité dans le phénotype CMD avec hyperlaxité.

Mots clés

Génétique, analyse de liaison, hyperlaxité, congénitale, dystrophie musculaire.

Abstract

Congenital muscular dystrophies are a heterogeneous group of disorders characterized by hypotonia and muscle weakness. The international consortium classified the CMDs in five groups according to their clinical and molecular characteristics. The different genes associated with CMDs are extracellular matrix or basal lamina constituents. The CMD with hyperlaxity, the Ullrich congenital muscular dystrophy (UCMD), is part of one of these groups.

UCMD is associated with proximal contractures and distal hyperlaxity. Mutations in the three genes coding for the collagen VI subunits (A1, A2 and A3) are responsible for this disease. Clinical and genetic heterogeneity is more and more often observed with this phenotype combining CMD and hyperlaxity. In this study, we are describing a cohort of 14 affected French Canadians from the south west region of Quebec with a mild phenotype of CMD with articulation hyperlaxicity (CMDH). We had to consider the genes coding for the collagen VI protein as good candidates since the CMDH and UCMD patients share clinical features. By linkage and sequencing analyses we have excluded these loci as responsible for this phenotype in our cohort.

Given these results, a genome wide scan (7cM density) was performed for two of the families to identify interesting loci. By LOD score analysis using Genehunter, we identified a region on chromosome 3 (LOD score 2,5). Fine mapping studies with the entire cohort allowed us to determine a 5cM interval at the 3p23-21.3 locus with a maximum LOD score of 5,3.

The identification of this new locus shows the presence of heterogeneity in the CMD with hyperlaxity phenotype.

Key words

Genetics, linkage, hyperlaxity, congenital, muscular dystrophy.

Table des matières

Résumé	III
Mots clés	IV
Abstract	V
Key words	VI
Table des matières	VII
Liste des figures	X
Liste des tables	XI
Liste des sigles et abréviations	XII
Remerciements	XIV
Avant propos	XV
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	
1.1 Classification des dystrophies musculaires congénitales (CMD)	2
1.2 Hyperlaxité ligamentaire	7
1.2.1 Dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich (UCMD)	8
1.2.2 Myopathie de Bethlem (BM)	10
1.2.3 Syndrome Marfan type 1 (MFS1)	10
1.2.4 Syndrome Marfan type 2 (MFS2)	12
1.2.5 Syndrome d'Ehlers Danlos (EDS)	12
1.2.6 Syndrome familial d'instabilité des articulations	13
CHAPITRE 2 : COHORTE DE PATIENTS	
2. Introduction : recrutement des patients	16
2.1 Recrutement de la cohorte canadienne-française	16
2.2 Matériels et méthodes : recrutement des patients	21

CHAPITRE 3 : EXCLUSION DE GENES CANDIDATS

3.	Introduction : exclusion	23
3.1	Exclusion du collagène VI	23
3.1.1	Étude d'immunochimie et d'immunohistochimie	24
3.1.2	Exclusion de COL6A1/A2 par analyse de liaison	26
3.1.3	Exclusion de COL6A3 par analyse de liaison et séquençage	29
3.2	Exclusion de gènes candidats	32
3.2.1	Résultats : exclusion des gènes candidats	34
3.3	Matériels et méthodes : exclusion des gènes candidats	34
3.4	Conclusion sur l'exclusion de loci candidats	38

CHAPITRE 4: ARTICLE: A NEW CONGENITAL MUSCULAR
DYSTROPHY WITH HYPERLAXITY MAPS TO 3p23-21.3

4.	Introduction de l'article: A New Form of Congenital Muscular Dystrophy with Joint Hyperlaxity Maps to 3p23-21.3	41
4.1	Contribution des co-auteurs	44
4.2	Article: A New Congenital Muscular Dystrophy with Joint Hyperlaxity Maps to 3p23-21.3	46
4.3	Conclusion de l'article	64

CHAPITRE 5: DISCUSSION

5.1	Conclusion du projet	66
5.1.1	Particularités cliniques de cette nouvelle forme de dystrophie musculaire avec hyperlaxité	66
5.1.2	Phénotype chez les parents	67
5.1.3	Maladie à effet fondateur québécois	68
5.1.4	Intervalle candidat	69

5.1.5 Patients canadien-français non liés au locus sur le chromosome 3p23-21.3	70
5.2 Perspectives à venir	71
5.2.1 Criblage des gènes candidats	71
5.2.2 Analyse de liaison pour d'autres populations au locus 3p23-21.3	72
5.2.3 Identification d'un nouveau locus pour une CMD avec hyperlaxité	73
5.2.4 Hyperlaxité et retard moteur	74
RÉFÉRENCES	74
ANNEXE 1 : LOD SCORE	i
ANNEXE 2 : CALCULS DU LOD EN DEUX POINTS	ii
ANNEXE 3 : CALCULS DU LOD EN MULTIPPOINTS	iii
ANNEXE 4 : AUTORISATION DES CO-AUTEURS	iv

Liste des figures

Figure 1 : Schéma démontrant les principales protéines de la matrice extracellulaire, la lame basale et le complexe glycoprotéique.

Figure 2 : Arbres généalogiques des 11 familles canadienne-françaises recrutées.

Figure 3 : Origine régionale des patients canadien-français de la cohorte CMD avec hyperlaxité.

Figure 4 : Détection de la présence du collagène VI.

Figure 5 : Résultats de génotypage du gène COL6A3.

Figure 6 : Résultats des haplotypes de la région positive du chromosome 3 pour les familles G et I.

Figure 7 : Résultats du GWS pour les 22 chromosomes.

Liste des figures de l'article

Figure 1: Pedigrees of the CMDH cohort

Figure 2: Clinical features and collagen VI immunohistochemistry on muscle and myoblasts.

Figure 3: Linkage and haplotype analyses.

Liste des tables

Table I : Les différentes formes de dystrophies musculaires congénitales.

Table II : Données cliniques des 13 patients de la cohorte.

Table III : Mutations répertoriées dans les trois gènes codant pour le collagène VI en date de janvier 2004.

Table IV : Calculs des valeurs de LOD pour les gènes COL6A1 et COL6A2.

Table V : Calculs des valeurs de LOD pour le gène COL6A3.

Table VI : Calculs des valeurs de LOD score deux points pour les gènes candidats : HSPG2, COL4A3/A4, DAG1, ITGA1/A2, DCN, COL2A1, COL4A1/A2.

Liste des tables de l'article

Table 1: Clinical variables on 14 French Canadian CMDH patients.

Liste des sigles et des abréviations

ACVR2B :	activin II B receptor
ADN :	acide désoxyribonucleic
ARN :	acide ribonucleic
ARSCACS:	ataxie spastique Charlevoix Saguenay
BM :	myopathie de Bethlem
cDNA :	acide désoxyribonucleic complémentaire
CF :	fibrose kystique
CHUM :	centre hospitalier de l'université de Montréal
CK :	créatine kinase
cM :	centi Morgan
CMD :	dystrophie musculaire congénitale
CMDH :	dystrophie musculaire congénitale avec hyperlaxité
COL2A1 :	collagène 2 alpha 1
COL3A1 :	collagène 3 alpha 1
COL4A1 :	collagène 4 alpha 1
COL4A2 :	collagène 4 alpha 2
COL4A3 :	collagène 4 alpha 3
COL4A4 :	collagène 4 alpha 4
COL6A1 :	collagène 6 alpha 1
COL6A2 :	collagène 6 alpha 2
COL6A3 :	collagène 6 alpha 3
DAG1 :	dystrophin associated glycoprotein
DCN :	decorin
EDS :	syndrome Ehlers Danlos
ENMC :	European neuromuscular center
FBN1 :	fibrillin-1
FCMD :	dystrophie musculaire congénitale Fukuyama

GDB :	genome data base
GWS :	genome wide scan
HHH :	hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria
HL :	hyperlaxité ligamentaire
HSAN II :	névrite sensitive héréditaire de type II
HSPG2 :	heparan sulfate proteoglycan
ITGA1 :	intégrine alpha 1
ITGA2 :	intégrine alpha 2
ITGA7 :	intégrine alpha 7
ITGA9 :	intégrine alpha 9
ITGB1 :	intégrine beta 1
LAMA2 :	laminin α -2
LAMR1 :	laminin receptor 1
LHON :	neuropathie optique de Leber
LOD :	logarithm of odds
Mb :	méga base
MEB :	muscle-eye-brain
MDR51 :	dystrophie musculaire avec rigidité de la colonne
MFS :	syndrome Marfan
MFS1 :	syndrome Marfan type 1
MFS2 :	syndrome Marfan type 2
PCR :	polymerase chain reaction
RT-PCR :	reverse transcriptase PCR
SNP :	single nucleotide polymorphism
TGF :	transforming growth factor
TGFR2 :	transforming growth factor receptor 2
TNXB:	Tenascin-XB
UCMD :	dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich
WWS :	syndrome Walker Warburg

Remerciements

Un grand merci à mon superviseur le Dr. Bernard Brais pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir partagé avec moi un projet extraordinaire. Sur les plusieurs projets du laboratoire, il a su me confier le projet qui correspondait le plus à mes attentes. Je souhaite que mon avenir dans son laboratoire me permette de travailler sur d'autres belles histoires de la génétique.

J'aimerais remercier une grande amie, Isabelle Thiffault, pour ses précieux conseils et son aide. Merci d'avoir pris le temps de lire et corriger cette thèse. C'est avec elle que j'ai effectué mes premiers pas en laboratoire et j'espère avoir la chance de travailler avec elle pendant encore longtemps.

Merci à tous les patients et leur famille, les médecins et les autres membres du laboratoire qui ont participé à cette étude. Sans eux, le projet n'aurait pas été possible.

Je suis particulièrement reconnaissante envers mes parents, Donna et Michel. Sans leur amour, leurs encouragements et leur support tout au long de mes études, le parcours aurait été plus difficile.

Un grand merci à Rocky, mon amoureux depuis les huit dernières années. Son amour, son humour et sa compréhension m'ont été d'un grand support dans les hauts et les bas de la recherche et des études.

Avant-propos

La science et la biologie humaine fascinent le monde depuis déjà longtemps. Dans ce nouveau millénaire, la génétique semble avoir prise une place d'importance. Avec le projet du séquençage du génome humain et plus récemment le projet Hapmap, la génétique est de plus en plus médiatisé et présente dans le quotidien des gens.

Mon orientation vers la biologie humaine et la génétique a débuté au niveau secondaire. C'est en secondaire quatre dans un cours de biologie traitant de génétique que tout a commencé. C'est avec des larmes aux yeux que le professeur nous annonçait qu'il prenait sa retraite. Il faisait avec nous son dernier voyage dans la complexité moléculaire du corps humain. Durant toute l'année, il nous a transmis sa passion pour la génétique en nous parlant d'ADN, de gène et d'hérédité. À ce moment, j'étais convaincue de vouloir travailler dans un domaine touchant la biologie humaine.

C'est quelques années plus tard, que j'ai eu la chance de travailler dans un laboratoire de recherche en génétique dans le cadre d'un stage au niveau baccalauréat. J'ai débuté ma formation sous la supervision du Dr. George Chong du laboratoire de médecine moléculaire et génétique des cancers de l'hôpital Général Juif de Montréal. Mon projet sur les cancers du colon héréditaire m'a permis d'apprendre les concepts et les techniques de base touchant la recherche en génétique. Après un an passé dans ce laboratoire, il n'y avait plus aucun doute, la recherche en génétique était faite pour moi.

Je me suis mise à la recherche d'un laboratoire de génétique pour effectuer ma maîtrise. C'est sur le laboratoire du Dr. Bernard Brais que c'est arrêté mon choix. En acceptant de me prendre dans son laboratoire, le Dr. Brais m'a confié un projet visant à effectuer une caractérisation génétique d'une dystrophie musculaire congénitale avec hyperlaxité. Après un peu plus de deux ans sous sa supervision, nous avons atteint les objectifs de départ et même plus. Nous avons écrit une belle histoire de génétique au Québec permettant d'aider les patients du présent et du futur. L'avenir nous permettra peut-être de résoudre d'autres mystères de la génétique. À mon tour, je donne des conférences sur la génétique dans les écoles secondaire, peut-être que ma passion pour ce domaine sera transmise à un élève et que lui aussi décidera de poursuivre dans cette voie.



Chapitre 1

Introduction

1. Introduction

1.1 Classification des dystrophies musculaires congénitales (CMD)

Les dystrophies musculaires congénitales (CMD) sont un groupe de maladies transmises suivant un mode autosomique récessif. Tout comme les autres syndromes congénitaux, les maladies se présentent dès la naissance, et ce même si le diagnostic est arrêté pendant l'enfance. Les CMDs sont caractérisées par de l'hypotonie, de la faiblesse musculaire et des contractures¹. La faiblesse musculaire observée chez les enfants CMD est associée à une perte de tonus de tous les muscles du corps et non seulement certains groupes musculaires. Selon les données épidémiologiques, les CMDs auraient une incidence de 1/100 000 naissances et une prévalence de 1/1 000 000 au niveau mondial^{1,1.2}. À ce jour, beaucoup des protéines impliquées dans les CMDs sont des protéines agissant dans l'interaction des cellules musculaires avec la matrice extracellulaire³ (Figure 1). Parmi ceux ci, nous retrouvons des récepteurs de la surface cellulaire (intégrines), des protéines de la lame basale (laminines) et des protéines de la matrice extracellulaire (collagènes). Les CMDs constituent un groupe de maladie hétérogène ce qui a poussé un groupe européen à former un consortium international pour l'étude des CMD; ENMC (table I). Ce groupe de scientifique a élaboré une nouvelle classification permettant de regrouper les CMDs en cinq groupes^{3,4}.

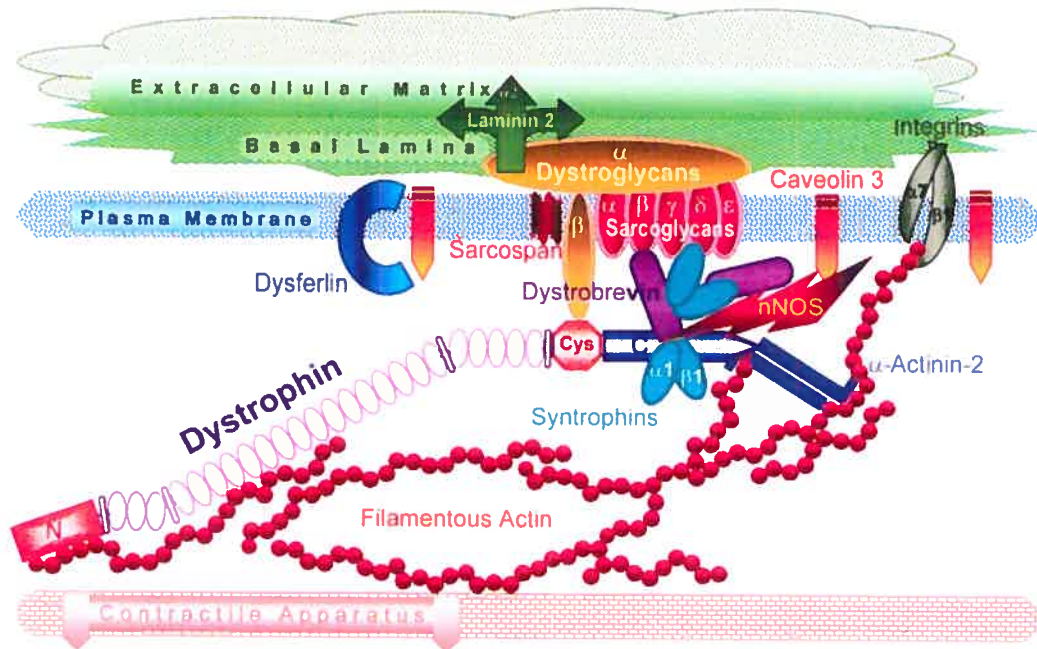


Figure 2. Schematic diagram of dystrophin and other proteins at the muscle plasma membrane. Not drawn to scale.

Figure 1 : Schéma démontrant les principales protéines constituant la matrice extracellulaire, la lame basale et le complexe glycoprotéique. Image tirée de l'ouvrage de Anderson et al. 2002.

Table 1 : Les différentes formes de dystrophies musculaires congénitales

Dystrophie Musculaire Congénitale						
Maladie	Hérédité	Position	Symbol de la maladie	Symbol du gène (protéine)	OMIM	Références
CMD déficiente en Mérosine	AR	6q2	MDC1A	Chaine lamrin α2 (LAMA2)	156225	Tome et al. 1994 Hillaire et al. 1994 Hebling Leclerc et al. 1995
CMD Fukuyama	AR	9q31-q33	FCMD	Fukutin (FCMD)	253800	Toda et al. 1993 Kobayashi et al. 1998
CMD avec déficience en intégrine	AR	12q13		Integrin α7 (ITGA7)	600536	Hayashi et al. 1998
syndrome Muscle-eye-brain	AR	1p3	MEB	O-mannose b-1-2-N-acetylglucosaminyl transferase (POMGNT1)	253280	Yoshida et al. 2001
syndrome Walker-Warburg	AR	9q34	WWS	O-mannosyl transferase (POMT1)	236670	Bertran-Valero De Bernabe et al. 2002
syndrome rigidité de la colonne	AR	1p36	RSMD1	Selenoprotein N1 (SEPN1)	602771	Moghadaszadeh et al. 1998 Moghadaszadeh et al. 2001 Ferreiro et al. 2004
CMD avec déficience secondaire en mérosine (1)	AR	1q42	MDC1B		604801	Brockington et al. 2000
CMD avec déficience secondaire en mérosine (2)	AR	19q1	MDC1C	Fukutin related protein (FKRP)	606812	Brockington et al. 2001 Topaloglu et al. 2003
CMD avec retard cognitif sévère et glycosylation du dystroglycan anormale	AR	22q12	allelique LGMD2l MDC1D	Like-glycosyltransferase (LARGE)	603590	Longman et al. 2003
CMD Ulrich	AR	21q22	UCMD	Collagen type 6 α2 (COL6A2)	254090	Camacho-Varegas et al. 2001
	AR	21q22	UCMD	Collagen type 6 α1 (COL6A1)		
	AR	2q37	UCMD	Collagen type 6 α3 (COL6A3)	254090	Demir et al. 2002

allelic myopathie de bethlem

Le premier groupe est composé des CMDs avec une déficience primaire de laminin- α 2. Cette forme de CMD compte pour 50% des dystrophies musculaires congénitales dans la population caucasienne, ce qui en fait la plus commune^{5,6}. Les patients sont atteints d'une hypotonie généralisée et d'une faiblesse musculaire qui atteint de façon prédominante les muscles du visage, du tronc et des extrémités et ce de manière symétrique. Au niveau moléculaire, une absence complète de laminin- α 2 est observée, ce qui a mené à l'identification de mutations dans le gène LAMA-2 situé sur le chromosome 6q24. La laminin- α 2 est une protéine structurale présente dans la matrice extracellulaire. Cette protéine est reconnue pour interagir avec les intégrines⁷.

Le second groupe est composé des dystrophies musculaires congénitales avec des anomalies de la migration cérébrale et cérébelleuse. Ce groupe est constitué de trois CMD soit Fukuyama (FCMD), muscle-eye-brain disease (MEB) et Walker Warburg syndrome (WWS)⁴. FCMD a tout d'abord été identifié dans la population japonaise avec une incidence d'environ 1/100 000, ce qui lui confère le deuxième rang des dystrophies musculaires de l'enfant au Japon précédé seulement par la dystrophie musculaire de Duchenne⁴. Les patients sont atteints d'une hypotonie généralisée et d'une faiblesse musculaire plus proéminente au niveau des jambes. Des mutations ont été identifiées dans le gène codant pour la Fukutin située sur le chromosome 9q31. Les cas de muscle-eye-brain (MEB) se présentent comme des enfants mous (floppy infant) causé par une hypotonie généralisée et une faiblesse musculaire diffuse. Cette maladie a été liée au chromosome 1p32-p34⁸. Walker Warburg syndrome (WWS)

chevauche avec MEB au niveau des caractéristiques cliniques. Les patients WWS se présentent aussi avec un détachement de la rétine combiné à une l'hydrocéphalie⁴.

Les dystrophies musculaires congénitales avec rigidité de la colonne constituent le troisième groupe (Rigid-spine, MDRS1). Ce groupe de CMD a aussi été identifié comme une forme de dystrophie musculaire laminin- α 2 positive. La caractéristique clinique principale de cette maladie est une limitation de la flexion de la colonne dorsolombaire et cervicale⁹. Le locus sur le chromosome 1p35-36 a été identifié comme étant responsable de la MDRS1, mais plusieurs cas non liés à ce locus n'ont toujours pas été expliqués¹⁰.

L'importance de la laminin- α 2 dans la structure musculaire est encore une fois démontrée par le quatrième groupe de CMD soit celui caractérisé par une déficience secondaire de cette protéine. Malgré un marquage anormal de la protéine laminin- α 2 dans les tissus des patients, le gène LAMA-2 n'est pas en cause mais serait plutôt lié au locus 1q42^{11,12}. L'identification de ces deux loci n'explique pas tous les cas. Des patients ayant une déficience partielle de laminin- α 2 et une réduction de laminin- β 2 ne sont pas liés au locus 6q2 (LAMA-2) et 1q42^{12,13}. De même, des patients avec une déficience secondaire de laminin- α 2 mais cette fois avec un retard mental ont aussi été décrit et ne sont pas liés aux loci mentionnés précédemment. Des mutations dans plusieurs gènes sont donc responsables d'une présentation clinique de CMD avec déficience partielle de laminin- α 2.

Le cinquième groupe est constitué d'un grand nombre de maladies hétérogènes. Ces maladies sont caractérisées par une expression normale de la protéine laminin- α 2. Un grand nombre de ces cas ont une dystrophie musculaire congénitale dite « pure » car leur intelligence est normale. Environ 30% à 50% des patients CMD d'origine caucasienne font partie de cette catégorie. De façon générale, les patients atteints d'une CMD laminin- α 2 positive ont la capacité d'acquérir une plus grande fonction motrice que les patients atteints d'une CMD laminin- α 2 négative^{14,15}. La dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich (UCMD) appartient à ce groupe. Les dystrophies musculaires congénitales laminin- α 2 positives avec retard mental compte pour environ 20% des CMD de ce groupe^{16,17}. Une plus faible proportion des patients avec une présence de laminin- α 2 présente en plus une hypoplasie cérébelleuse^{4,18}.

Un sixième groupe pourrait être créé pour les formes rares de CMD, décrite dans une seule famille ou dans des patients isolés. De plus, ces CMD ne possèdent pas pour l'instant de critères distinctifs leurs permettant d'entrer dans la classification élaborée par le ENMC⁴.

1.2 Hyperlaxité ligamentaire congénitale

Il existe un certain nombre de pathologies humaines où nous observons une hyperlaxité ligamentaire (HL) associées à d'autres signes cliniques. L'hyperlaxité ligamentaire est en fait un phénomène fréquemment observé lors de l'examen clinique. Nous estimons que de l'ordre de 15% de la population en manifeste. Dans certains sports tels

que la gymnastique ou le ballet l'HL est essentiel à la pratique à un haut niveau. L'HL est surtout depuis des décennies associés à des maladies cutanées et cardiovasculaires tel que le syndrome de Marfan. L'association d'une dystrophie musculaire congénitale avec un syndrome mixte de HL et de contracture est lui aussi très ancien (Otto Ullrich en 1930). Ceci étant dit, ce n'est qu'avec l'identification du substrat génétique de la dystrophie musculaire d'Ullrich en 2001¹⁹ que l'intérêt dans l'identification des différentes formes de dystrophies musculaires congénitales accompagnées d'HL est devenu un champ actif d'exploration scientifique. C'est dans ce climat de découverte internationale que s'inscrit ce mémoire. Dans les sections qui suivent nous résumerons les connaissances actuelles sur les syndromes d'hyperlaxité pathologique les mieux décrivent dans la littérature.

1.2.1 Dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich (UCMD)

La dystrophie musculaire congénitale de Ullrich (UCMD) est un syndrome commun caractérisé par des contractures proximales combinées à de l'hyperlaxité distale²⁰. Comme dans les autres CMD, les patients sont atteints d'une hypotonie et de faiblesse musculaire. La présence d'hyperlaxité et de faiblesse musculaire contribue au délai moteur observé chez les enfants UCMD, certains d'entre eux n'acquiescent pas l'habilité de marcher. En effet, une variabilité interfamiliale de la sévérité des symptômes semble exister²¹. D'autres caractéristiques cliniques sont observées chez les individus atteints de l'UCMD, scoliose, insuffisance respiratoire menant à la mort dans la première ou la deuxième décennie de vie, calcanéum proéminent,

intelligence normale et un taux sérique de créatine kinase (CK) normal ou légèrement élevé⁴.

C'est des mutations dans les trois gènes codant pour les sous unités du collagène VI (COL6) qui sont responsable de l'UCMD. Les études immunohistochimiques des tissus de patients démontrent une déficience partielle ou totale de la protéine dans la peau et les muscles²². Plus de 20 mutations récessives dans les trois gènes codant la protéine (COL6A1, COL6A2 et COL6A3) ont été identifiées^{19,21,23}. L'identification de mutation *de novo* avec une transmission autosomique dominante peut aussi causer des formes plus légères de cette maladie^{3,24,25}. Quelques cas avec un phénotype UCMD ont été répertoriés n'ayant aucune déficience en collagène VI et aucune mutation dans l'un des trois gènes n'a été trouvée, suggérant une hétérogénéité génétique^{20,26}. Certains de ces cas présentent des phénotypes distinctifs, comme celui que nous décrivons dans ce mémoire et ceux décrit par Mercuri et al.²⁶ où le phénotype UCMD est combiné à une petite stature et un léger retard cognitif. Les gènes codant pour le collagène VI ont été exclus²⁰.

Le collagène VI est une protéine ubiquitaire de la matrice extracellulaire constitué de trois sous unités : alpha-1, alpha-2 et alpha-3. Les gènes COL6A1 et COL6A2 sont situés sur le chromosome 21q22.3 et le gène COL6A3 au locus 2q37¹⁹. Chacune des trois sous unités est formée d'un domaine triple hélice central flanqué par une grande région N- et C- terminale. Le monomère de la protéine collagène VI est formé lorsque les trois chaînes s'associent pour assembler un hétérotrimère. C'est suite à la sécrétion que les microfibrilles sont formés^{19,27}. Le rôle proposé pour la protéine collagène VI est celui

d'ancrage de la membrane basale des fibres musculaires avec la matrice extracellulaire. Il est possible que le collagène VI soit aussi impliqué dans l'organisation des composantes de la matrice extracellulaire^{3,28}. De plus, le collagène a la propriété d'être capable d'interagir avec des récepteurs membranaires tel que les intégrines et les protéoglycans (NG2 decorin, biglycan), permettant ainsi la transmission des signaux de l'espace péri-cellulaire à l'espace intracellulaire.

1.2.2 Myopathie de Bethlem (BM)

La myopathie de Bethlem (BM) est une maladie rare à transmission autosomique dominante¹⁹. Les caractéristiques cliniques de cette myopathie chevauchent celles de l'UCMD. On observe très tôt dans l'enfance une faiblesse musculaire généralisée et des contractures à de multiples articulations affectant surtout les épaules, les chevilles ainsi que les doigts²³. Dans les cas les plus sévères, une hyperlaxité distale est observée. Des mutations ont été identifiées dans les gènes COL6A1, COL6A2 et COL6A3 tout comme l'UCMD, démontrant ainsi l'importance de la protéine collagène VI dans la composition de la matrice extracellulaire du muscle squelettique²⁷.

1.2.3 Syndrome Marfan type 1 (MFS1)

Le syndrome Marfan de type 1 (MFS1) est une maladie des tissus conjonctifs héréditaire démontrant une grande variabilité clinique. Les

caractéristiques cliniques de ce syndrome touchent trois systèmes du corps soit squelettique, oculaire et cardiovasculaire. Parmi les déformités squelettiques nous observons des patients de taille supérieure à la moyenne, des extrémités et des doigts de longueur disproportionnée, déformité du thorax et de la colonne vertébrale (scoliose, lordose thoracique), palais étroit et arché, déformité au niveau de la dentition, contractures et présence de laxité dans les articulations. Certaines de ces caractéristiques chevauchent celles de l'UCMD et BM. Nous n'observons pas chez les patients MFS1 de faiblesse musculaire et d'anomalie dans les fibres musculaires lors de la biopsie comme c'est le cas dans UCMD et BM. Au niveau des yeux, nous observons dans les individus MFS1 de la myopie, une augmentation de la taille axial du globe, une cornée plate et ectopia lentis. Pour le système cardiovasculaire les phénotypes observés sont des malformations de la valve mitrale, de la régurgitation mitrale, une dilatation de la racine de l'aorte et de la régurgitation aortique. Dans les cas de MFS atypique sévère nous observons d'avantage de complication au niveau cardiovasculaire nécessitant une chirurgie ainsi qu'un visage et des oreilles anormales.

Le gène de la fibrillin-1 (FBN1, 15q21.1) est responsable du syndrome Marfan de type 1^{29,30}. Les immunofluorescences de biopsies de patients MFS1 ont démontré une déficience en fibrillin-1, une glycoprotéine impliquée dans le système des fibres élastiques³¹. Plusieurs mutations ont été identifiées dans ce gène. L'effet pathogène des mutations FBN1 dans le syndrome MFS peut être expliqué dans la majorité des cas par un défaut affectant la synthèse de la protéine, la sécrétion de la protéine ou l'incorporation de la protéine dans la matrice. Des

mutations dans le gène collagène 1 alpha 2 ont été identifiées dans quelques cas de MFS atypique.

1.2.4 Syndrome Marfan de type II (MFS2)

Le syndrome Marfan de type II (MFS2) est une maladie du tissu conjonctif à transmission autosomique dominante³². MFS2 partage avec MFS1 les caractéristiques cliniques touchant le squelette et le système cardiovasculaire. Aucun phénotype oculaire n'est observé chez les patients MFS2 contrairement à MFS1, ce qui en fait une entité distincte.

Un criblage du génome a permis de lier les familles MFS2 au locus 3p25-24³³ et par la suite d'identifier le gène TGFBR2 (transforming growth factor receptor type 2) comme étant responsable de la maladie. En effet, plusieurs mutations ont été identifiées dans ce gène³⁴. La majorité de ces mutations cause une perte de fonction de l'activité de signalisation de TGF-beta dans la formation de la matrice extracellulaire.

1.2.5 Syndrome d'Ehlers Danlos (EDS)

Le syndrome d'Ehlers Danlos (EDS) est caractérisé par une grande hétérogénéité phénotypique et génétique. C'est la classification de Beighton qui est utilisée pour différencier les différentes formes de EDS. Deux formes de EDS constituent les formes classiques : EDS I la forme

sévère et EDS II la forme modérée. EDS III est la forme bénigne caractérisée par l'hypermobilité ligamentaire. EDS IV est la forme artérielle et EDS V celle liée au chromosome X. EDS VI est la forme causée par une déficience en lysyl hydroxylase et EDS VII par une déficience en protéase procollagène. L'une des formes est accompagnée de périodontose, EDS VIII, et une autre est la forme avec des cornes occipitales à l'échographie fœtale, EDS IX ou cutis laxa. EDS X est probablement causé par un défaut au niveau de la fibronectine. Il y a six autres formes de EDS incluant la catégorie des formes non spécifiques³⁵. Les caractéristiques cliniques principales de EDS III sont une hyperextensibilité marquée des articulations sans déformation squelettique. Cette forme est souvent comparée avec le syndrome familial d'instabilité des articulations. Plusieurs gènes sont responsables de ce phénotype. Parmi ceux-ci on retrouve COL3A1³⁶ aussi muté dans EDS IV et le gène encodant la Tenascin-XB (TNXB)³⁷. L'élasticité des articulations est tout de même observée dans d'autres formes d'EDS : EDS I, EDS II, EDS IV, EDS VI, EDS VII et EDS VIII.

1.2.6 Syndrome familial d'instabilité des articulations

Ce syndrome familial, aussi appelé EDS type XI, est transmis de manière autosomique dominante. Les patients souffrent, en association avec l'hyperlaxité des articulations, de dislocation articulaire récurrente. Ces dislocations sont observées plus particulièrement au niveau des épaules. Dans certaines familles des dislocations congénitales au niveau des hanches sont aussi observées. Contrairement à plusieurs maladies affectant les tissus conjonctifs, aucun phénotype de la peau n'est observé chez les patients atteints de ce syndrome.



Chapitre 2

Cohorte de patients

2 Introduction : Recrutement des patients

L'objectif de ce projet de recherche est de découvrir les défauts génétiques menant à un phénotype de dystrophie musculaire congénitale avec hyperlaxité. Plusieurs étapes sont nécessaires avant d'atteindre cet objectif. La première d'entre elles est de recruter des individus atteints d'un tel phénotype ainsi que les membres de leur famille. C'est avec l'aide de plusieurs neurologues sous la direction du Dr. Bernard Brais que cette étape a pu être complétée. Le laboratoire du Dr. Bernard Brais travaille principalement sur les maladies neurologiques héréditaires plus fréquente chez les Canadiens français. Comme le phénotype de dystrophie musculaire congénitale avec hyperlaxité semble fréquent dans cette population, il nous a semblé intéressant de recruter une cohorte canadienne-française afin d'effectuer une étude génétique sur ce phénotype.

2.1 Recrutement de la cohorte canadienne-française

Nous avons recruté 14 individus démontrant un phénotype de dystrophie musculaire avec hyperlaxité relativement homogène appartenant à 11 familles (Figure 2). Il n'existe aucun lien de parenté connu entre ces familles. Les parents des individus 11 et 12 (famille I) sont consanguins. En effet, ils sont cousins au troisième degré. La ségrégation de la maladie semble suggérer une transmission autosomique récessive. Aucun des parents ni l'enfant de l'individu 11 (famille I) ne sont atteints de cette dystrophie, quoi que plusieurs sont hyperlaxes. Ce qui caractérise principalement notre cohorte au niveau

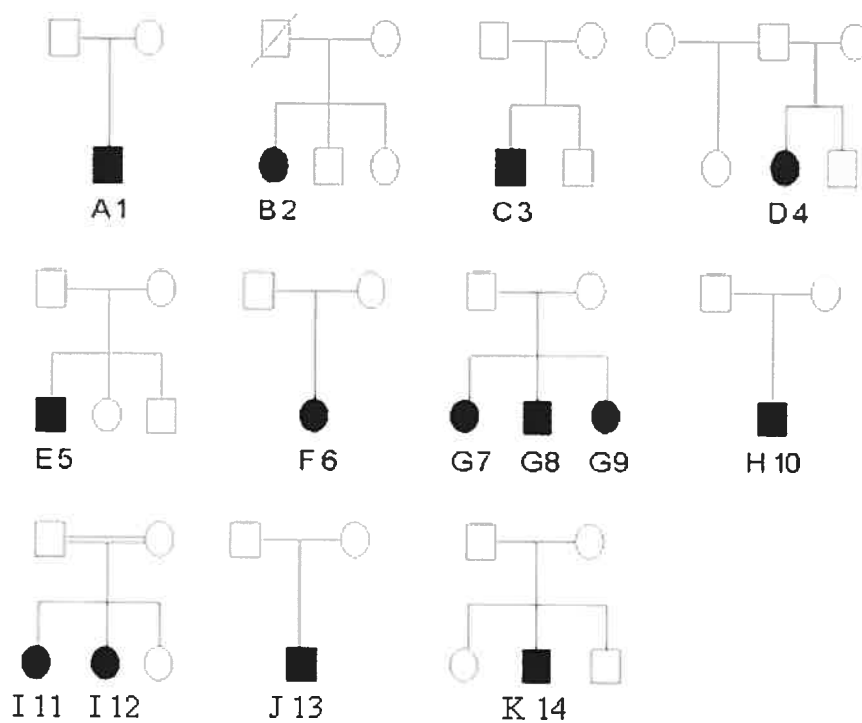


Figure 2 : Arbres généalogiques des 11 familles canadienne-françaises recrutées.

clinique c'est la présence combinée de contractures et d'hyperlaxité. Les patients ont en plus une faiblesse musculaire marquée qui dans tout les cas a mené à un retard moteur (début de la marche entre 14 mois et trois ans) (Table II). Certains de nos patients démontrent de l'insuffisance respiratoire et une scoliose de modéré à sévère. Il existe un chevauchement entre les cas de dystrophie musculaire congénital d'Ullrich répertoriés et notre cohorte canadienne-française puisqu'on y retrouve sensiblement le même phénotype²³. Les caractéristiques cliniques des individus participants à l'étude sont discutées plus explicitement dans le Chapitre 4 contenant l'article³⁸.

Les familles recrutées pour notre étude proviennent toutes de la région sud-ouest du Québec (Figure 3). La concentration géographique des cas ainsi que l'homogénéité clinique des individus recrutés suggère que le phénotype de dystrophie musculaire avec hyperlaxité est un nouvel effet fondateur de la population québécoise. Si cela s'avère le cas, ce serait le premier effet fondateur décrit pour ce phénotype, et le deuxième seulement, après la CMD de Fukuyama, pour une dystrophie musculaire congénitale. Un effet fondateur se produit lorsqu'une nouvelle population est fondée par un petit groupe de fondateurs porteurs d'une petite fraction de la variation génétique totale de la population d'origine³⁹. Dans ce cas, un gène particulier se trouve concentré au sein de la nouvelle population.

Table II : Données clinique des 14 patients de la cohorte.

Case number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Family	A	B	C	D	E	F	G	G	G	H	I	I	J	K
Sexe	male	female	male	female	male	female	female	male	female	male	female	female	male	male
Age at diagnosis	2	4	6	3	6	1	5	5	5	3	4	2	0	7
Age in 2005	16	40	28	29	18	22	24	17	19	10	39	24	19	35
Distal laxity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Contractures	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CNS involvement	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scoliosis	++	++	++	++	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Ability to walk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lost ability to walk (age)	-	28	-	-	-	10	-	-	-	-	32	-	-	-
Abnormal pulm. f.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
%VC at age	30	59	50	93	69	21	53	77	66	100	63	86	38	-

VC: Vital capacity; blank: Not tested; 0 = birth

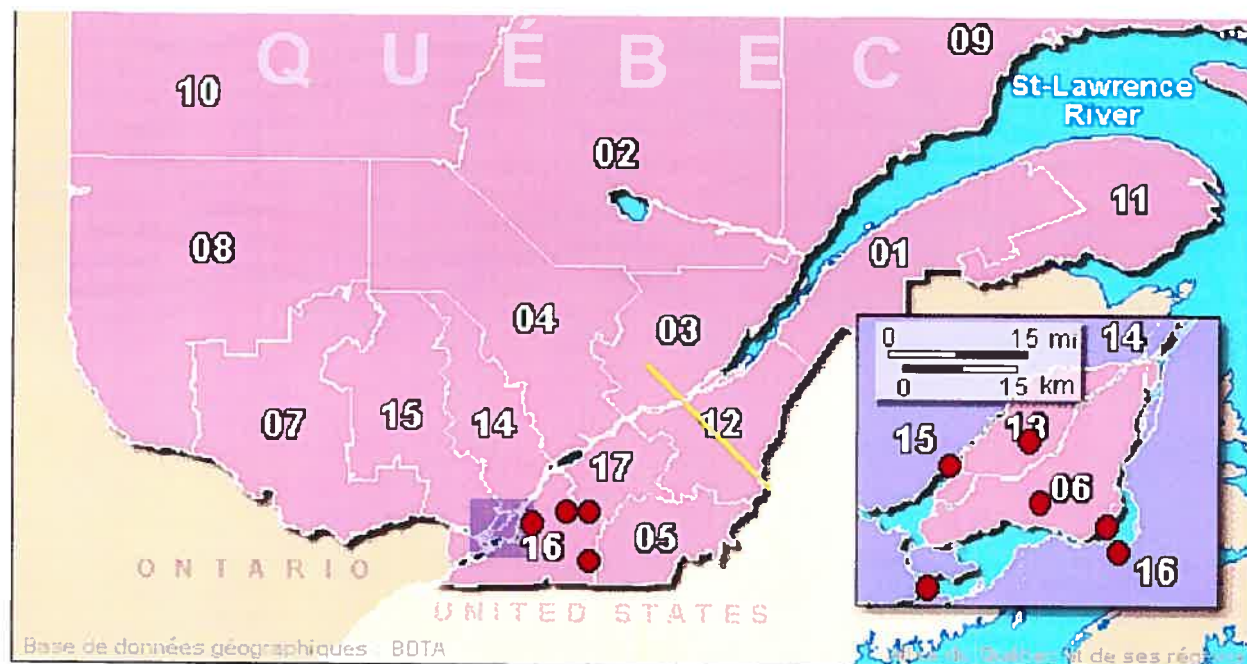


Figure 3 : Origine régionale des patients canadiens-français de la cohorte de CMD avec hyperlaxité.

2.2 Matériels et méthodes : recrutement des patients

Chaque individu recruté pour l'étude a été soumis à un examen neurologique par le Dr. Bernard Brais. Les patients ont été vus au CHUM-Hôpital Notre-Dame, au Centre de réadaptation Marie-Enfant et au Centre de réadaptation Lucie-Bruneau. Tous les patients et les membres de leur famille participant à l'étude ont signé un consentement approuvé préalablement par le comité d'éthique du CHUM.



Chapitre 3

Exclusion de gènes candidats

3. Introduction : Exclusion

Hypothèses du projet :

1. Identifier par analyse de liaison lequel des loci (chromosome 21q22.3 ou 2q37) est responsable de la maladie dans notre cohorte.
2. Identifier par séquençage directe de l'ADN génomique ou par séquençage du cDNA de l'un des trois gènes (COL6A1, COL6A2 ou COL6A3) les mutations responsables du phénotypes.

Avant d'entreprendre des analyses poussées de criblage entier du génome, il est important d'exclure les loci connus pouvant être associé à notre phénotype. Nous présentons donc toutes les expériences qui ont constituées la première étape de ce projet de recherche.

3.1 Exclusion du collagène VI

Le phénotype de dystrophie congénitale avec hyperlaxité a été jusqu'à maintenant associé avec l'UCMD et à un moindre degré avec BM²³. Ces maladies ont été associées depuis déjà plusieurs années avec des anomalies d'expression de la protéine collagène VI³. En effet, plusieurs mutations dans les trois gènes codant pour les sous-unités (A1, A2 et A3) de cette protéine ont été répertoriées²³. La similitude des phénotypes entre notre cohorte et les patients UCMD décrit dans la littérature ont mené à l'hypothèse que les patients canadiens-français étaient liés à l'un des trois loci. Les résultats présentés ci-dessous sont repris de manière concise dans l'article³⁸ (Chapitre 4).

3.1.1 Étude d'immunochimie et d'immunohistochimie

Dans la majorité des cas d'UCMD répertoriés dans la littérature, l'expression de la protéine collagène VI est altérée⁴⁰. Nous observons une déficience partielle ou complète de la protéine en plus d'anomalies musculaires. Une biopsie musculaire a donc été effectuée chez trois de nos patients (individu 6, 7 et 11). L'étude pathologique des tissus musculaire démontre clairement des anomalies au niveau des fibres musculaires, mais ces anomalies semblent non spécifiques. Dans tout les cas, nous avons observé une variation de la taille des fibres musculaires, une présence accrue de noyaux centraux ce qui suggère la présence de fibres en régénération, et une augmentation de la quantité de tissus conjonctifs dans les régions interstitielles. Afin de vérifier la présence de la protéine dans les tissus de nos patients, nous avons effectué une immunohistochimie sur les biopsies avec l'anticorps anti-collagène VI 5C6⁴¹ (Figure 4 A-B). Aucune déficience de la protéine n'a été observée chez nos patients. Nous avons aussi vérifié l'expression de la protéine avec des myoblastes en culture obtenus à partir de biopsies musculaires. La coloration des cellules avec des anticorps reconnaissant le collagène VI (MAB3303 et MAB1944) n'a démontré aucune déficience de la protéine (Figure 4 C-D). Ces résultats ne sont cependant pas suffisants pour exclure le collagène VI comme responsable du phénotype dans notre cohorte, puisque récemment des cas d'UCMD avec une mutation dans le collagène VI et aucune déficience de la protéine ont été identifiés³.

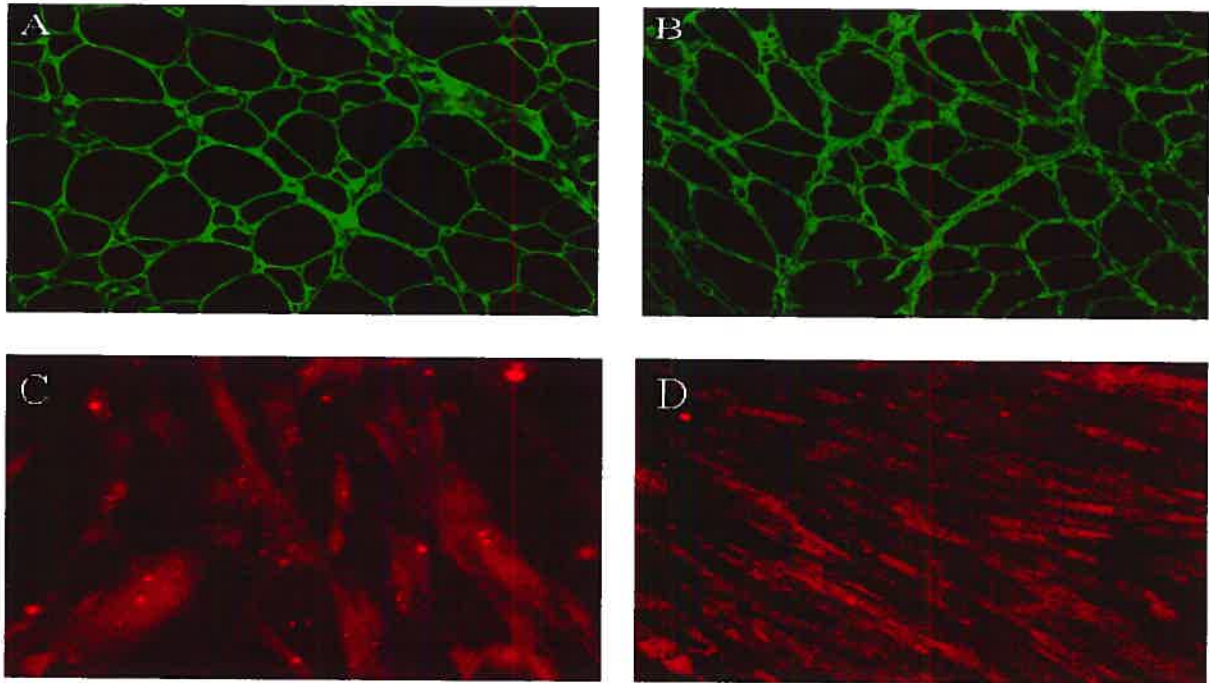


Figure 4 : Détection de la présence du collagène VI. **A)** Immunohistochimie sur un muscle contrôle avec l'anticorps 5C6. **B)** Immunohistochimie sur le muscle du patient 11 (famille I) avec l'anticorps 5C6. **C)** Immunohistochimie sur des myoblastes en culture d'un contrôle avec l'anticorps MAB1944. **D)** Immunohistochimie sur des myoblastes en culture du patient 6 (famille F) avec l'anticorps MAB1944.

3.1.2 Exclusion de COL6A1/A2 par analyse de liaison

Nous avons débuté l'analyse d'exclusion en testant par séquençage direct les mutations répertoriées dans la littérature (table III). Aucune de ces mutations n'ont été observées dans notre cohorte. Nous avons donc vérifié par analyse de liaison si les patients de notre cohorte étaient liés au loci COL6A1 et COL6A2. Ces deux gènes sont situés un à la suite de l'autre sur le chromosome 21q22.3¹⁹. Nous avons donc sélectionné des marqueurs microsatellites flanquant ces deux gènes ainsi qu'un marqueur intragénique au gène COL6A2. L'analyse de ces marqueurs sur un séquenceur d'ADN automatique LiCOR 4100 nous a permis d'établir un génotype pour chacune des familles de la cohorte. Les haplotypes créés à partir de ces génotypes n'ont démontré aucun partage d'allèle entre les individus atteints ce qui n'est pas suggestif d'une liaison de ces loci avec la maladie. Nous avons par la suite calculé la valeur de LOD pour ces marqueurs. L'analyse deux points a été effectué par le logiciel LINKAGE v. 2.0. Lors d'une analyse en deux points, le logiciel compare chaque marqueur avec la maladie sans tenir compte des marqueurs environnant et de la distance entre ceux-ci (Annexe 1). Nous avons obtenu pour chacun des trois marqueurs testés une valeur de LOD négative inférieure à -2 (Table IV). Ces résultats nous ont donc permis d'exclure les gènes COL6A1 et COL6A2 comme responsable de la maladie dans notre cohorte.

Table III : Mutations répertoriées dans les trois gènes codant le collagène VI en date de janvier 2004.

Location of mutation	Mutation	Consequence	Status	Reference
COL6A1 exon 8	Del 1.1Kb	Exon 9-10 skipping	Compound heterozygous	Pan et al. 2003
COL6A1 exon 14	Del 54pb	Exon 14 skipping	Compound heterozygous	Pan et al. 2003
COL6A2 exon 13	Ins C	Frameshift	Homozygous	Camacho Vanegas et al. 2001
COL6A2 intron 14	(-1)g to c	Ins 53pb or 247pb from intron sequence	Compound heterozygous	Ishikawa et al. 2002
COL6A2 intron 17	(-2)a to g	Del 28pb	Compound heterozygous	Camacho Vanegas et al. 2001
COL6A2 exon 18	Del 26pb	Frameshift	Homozygous	Higuchi et al. 2001
COL6A2 intron 23	(-1)g to a	Exon 24 skipping	Compound heterozygous	Camacho Vanegas et al. 2001
COL6A2 intron 23	(-3)c to g	Exon 24 skipping	Compound heterozygous	Ishikawa et al. 2002
COL6A2 intron 23	(+5)g to a	Exon 23 skipping	Compound heterozygous	Ishikawa et al. 2004
COL6A2 exon 26	Del 6pb		Compound heterozygous	Ishikawa et al. 2004
COL6A3 exon 5	Nonsense	Alternatively spliced variant	Homozygous	Demir et al. 2002
COL6A3 intron 29	(+5)a to g	In-frame del of 17aa.	Homozygous	Demir et al. 2002
COL6A3 exon 31	Nonsense	Premature termination	Homozygous	Demir et al. 2002

Pan et al. 2003²⁵; Camacho et al. 2001¹⁹; Higuchi et al. 2001²²; Ishikawa et al. 2004⁴⁰; Demir et al. 2002²¹

Table IV : Calculs des valeurs de LOD pour les gènes COL6A1 et COL6A2. Les valeurs des analyses deux points ont été calculées avec le logiciel MLINK (Linkage v.2.0) à t θ 0.

LOD teta 0			
Famille	D21S1255	COL6A2	D21S1893
A	0.00	0.00	0.00
B	-0.45	-0.70	0.12
C	0.00	-0.32	0.05
D	0.00	-0.45	-0.24
E	-0.50	-0.84	-0.63
F	0.00	0.00	0.00
G	-2.30	-3.12	-1.34
H	0.00	0.00	0.00
I	-4.45	-5.23	-3.13
TOTAL	-6.70	-10.66	-5.17

3.1.3 Exclusion de COL6A3 par analyse de liaison et séquençage

Nous avons effectué pour le gène COL6A3 le même exercice que les gènes COL6A1 et COL6A2. Nous avons débuté par le séquençage direct des mutations répertoriées dans la littérature afin de vérifier leur présence dans notre cohorte (Table III). Aucune ne s'est avérée présente chez nos patients. Dans le cas du gène COL6A3, nous avons choisi quatre marqueurs microsatellites flanquant le gène ainsi qu'un marqueur intragénique. Nous avons observé un certain partage d'allèle entre les individus atteints de notre cohorte pour cette région chromosomique. En effet, nos données préliminaire pouvaient être interprétées comme détectant le partage de trois chromosomes par la majorité de nos familles (Figure 5A). De plus, la valeur de LOD obtenue à ces marqueurs ne nous permettait pas d'exclure ce gène comme candidat (Table V). Afin de trouver les mutations responsables de la maladie dans notre cohorte ou d'exclure de manière significative ce gène, nous avons décidé de séquencer toute la région codante du gène avec de l'ARN obtenu pour trois de nos patients (patients 6, 7 et 11). Aucune mutation n'a été détectée par cette méthode, nous avons par contre identifié plusieurs polymorphismes SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (Figure 5B). La combinaison des données SNP avec les allèles des marqueurs microsatellites analysés précédemment, nous a permis d'observer qu'il n'y avait en fait aucun partage d'allèle entre les individus atteints. Cette dernière analyse nous a donc permis d'exclure avec certitude le gène COL6A3 comme celui responsable de cette nouvelle forme de dystrophie musculaire

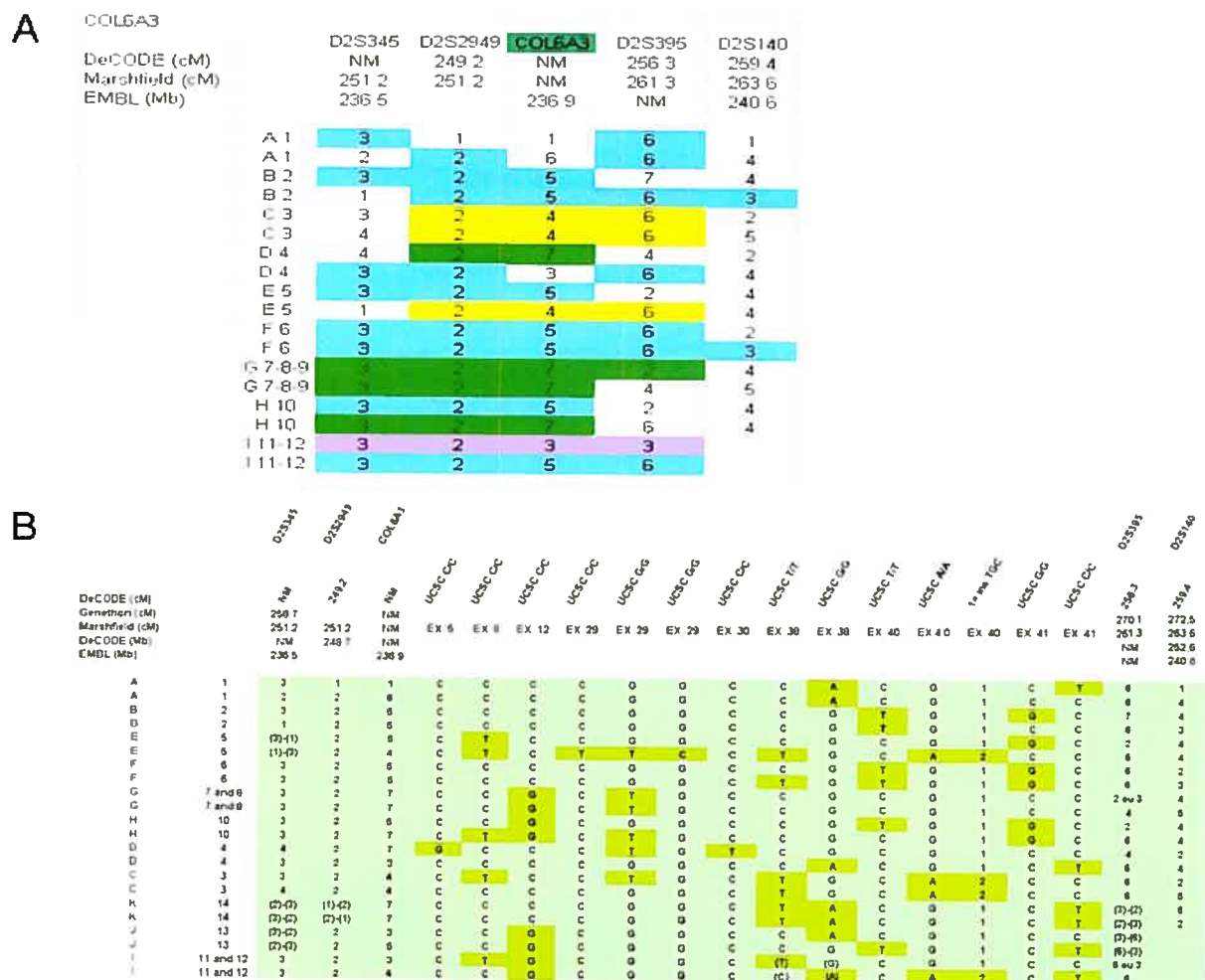


Figure 5 : Résultats de génotypage du gène COL6A3. **A)** Haplotype avec marqueurs microsatellites flanquant le gène. **B)** SNPs identifiés dans la région codante du gène, détruisant tout partage de chromosome.

Table V : Calculs des LOD score pour le gène COL6A3. Les valeurs en deux points ont été calculées avec le logiciel MLINK (Linkage v.2.0) à teta 0.

LOD teta 0					
Famille	D2S345	D2S2949	COL6A3	D2S395	D2S140
A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B	0.25	-0.45	-0.05	-0.53	-0.05
C	0.12	0.12	0.12	0.12	0.00
D	0.00	0.00	-0.00	0.00	0.00
E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G	0.30	0.00	0.60	-INFINI	-INFINI
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
I	0.00	0.00	0.73	-INFINI	0.00
TOTAL	0.67	-0.45	1.40	-INFINI	-INFINI

congénitale plus fréquente chez les Canadiens français.

3.2 Exclusion de gènes candidats

Suivant l'exclusion des trois gènes codant pour la protéine collagène VI, nous avons étudié par analyse de liaison d'autres gènes qui pouvaient constituer de bons candidats. Nous avons étudié des gènes impliqués dans d'autres CMD, des gènes interagissant avec le collagène VI ou des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire. Nous avons donc sélectionné 10 gènes pour analyses: protéoglycan heparan sulfate (HSPG2), collagène IV alpha 3 et alpha 4 (COL4A3/A4), glycoprotéine associée à la dystrophine (DAG1), intégrine alpha 1 et alpha 2 (ITGA1/A2), decorin (DCN), collagène II alpha 1 (COL2A1), collagène IV alpha 1 et alpha 2 (COL4A1/A2).

Le protéoglycan heparan sulfate (HSPG2) est une composante majeure de la membrane basale impliquée dans la stabilisation des autres cellules et dans l'adhésion de celles-ci. La transcription de cette protéine est régulée à la hausse par TGF-beta, un facteur de croissance impliqué dans le syndrome Marfan. L'importance de HSPG2 dans le maintien de l'intégrité des cartilages et la régulation de l'excitabilité des muscles est démontré par le syndrome Schwartz-Jampel. Des mutations dans le gène HSPG2 cause ce syndrome récessif caractérisé par de la myotonie et de la dysplasie squelettique⁴².

Le collagène IV est une protéine de la membrane basale. Les sous unités alpha-1 et alpha-2 se retrouvent dans toute les membranes

basales tandis que les sous unités alpha-3 et alpha-4 sont présentes seulement dans certains types de membrane basale mais toujours en paire⁴³. La protéine collagène IV formée par COL4A1 et COL4A2 est responsable de l'interaction entre les cellules⁴⁴. Nous supposons que COL4A3 et COL4A4 possèdent le même rôle dû à la similarité de l'organisation des protéines⁴³. Le gène COL4A1 est muté dans une porencéphalie familiale⁴⁵ et COL4A3 ainsi que COL4A4 sont mutés dans le syndrome Alport, une maladie des reins^{46,47}.

La protéine DAG1 est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire capable de lier les laminines, dont la laminine $\alpha 2$ muté dans une dystrophie musculaire congénitale⁴⁸. Une déficience de DAG1 a même été démontrée dans la CMD Fukuyama⁴⁹ démontrant qu'il est probable qu'une mutation dans DAG1 cause une dystrophie musculaire.

L'intégrine alpha 1 (ITGA1) forme un dimère avec la chaîne beta-1 (ITGB1) afin de former un récepteur pour les laminines ainsi que les collagènes⁵⁰. ITGA2 est une glycoprotéine se trouvant à la surface des cellules pouvant servir de récepteur pour les collagènes. De plus, un autre membre de la famille, l'intégrine alpha 7, est muté dans une CMD⁵¹ démontrant l'importance de la famille des intégrines dans l'intégrité des muscles.

La decorin (DCN) est un petit protéoglycan présent dans les tissus conjonctifs⁵². Le niveau d'ARNm de la DCN est largement diminué dans des cas présumément homozygotes du syndrome Marfan⁵³.

COL2A1 est en fait le collagène des cartilages. Plusieurs mutations ont déjà été identifiées dans ce gène causant différents phénotypes. Parmi ceux-ci, nous retrouvons le syndrome de Stickler où de l'hyperextensibilité des articulations est observé chez les patients⁵⁴.

3.2.1 **Résultats : exclusions de gènes candidats**

Pour chacun de ces gènes nous avons choisi des marqueurs microsatellites polymorphiques flanquant les gènes candidats, afin de compléter des études de liaison. Pour chacun des marqueurs, nous avons calculé la valeur de LOD score en deux points des familles génotypées. Voici les marqueurs utilisés : D1S478 pour HSPG2, D2S401 et D2S2185 pour COL4A3/A4, D3S3026 et D3S2384 pour DAG1, D5S1966 et D5S461 pour ITGA1/A2, D12S1311 et D12S95 pour DCN, D12S1701 et D12S1661 pour COL2A1, D13S1315 pour COL4A1/A2. Nous avons obtenu des valeurs de LOD score négatives ou non significatives pour chacun de ces marqueurs (table VI). Nous avons donc exclu ces gènes comme pouvant être responsable de notre phénotype.

3.3 **Matériels et méthodes : exclusion de gènes candidats**

Les biopsies musculaires ont été obtenues pour trois patients (patients 6, 7 et 11). Une analyse immunohistochimie a été performé avec l'anticorps 5C6 anti-collagène VI (Hybridoma Bank, Université d'Iowa, Iowa)⁴¹. Les muscles ont été purifié dans l'acétone et ensuite nettoyé dans le PBS. Incubation avec l'anticorps (1:20) pour une heure et

Table VI : Calculs des valeurs de LOD score deux points pour les gènes candidats : HSPG2, COL4A3/A4, DAG1, ITGA1/A2, DCN, COL2A1, COL4A1/A2. Les valeurs deux points ont été calculées avec le logiciel MLINK (Linkage v.2.0) à teta 0.

LOD teta 0	HSPG2	COL4A3 /A4	COL4A3/ A4	DAG1	DAG1	ITGA1/ A2	ITGA1/ A2	DCN	DCN	COL2A1	COL2A1	COL4A1/ A2
Famille	D1S 478	D2S 401	D2S 2185	D3S 3026	D3S 2384	D5S 1966	D5S 461	D12S 1311	D12S 95	D12S 1701	D12S 1661	D13S 1315
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	-0.4	0.25	0.12	-0.12	-0.72	0	0.25	0.25	0.25	0.12	-0.05	0.25
C	-0.18	-INFINI	-0.18	0.12	0.00	0.00	0.12	0.00	-0.83	0.12	0.12	0.12
D	0.00	-0.10	-0.00	-0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.1	0.00	0.00	0.00
E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G	0.30	0.30	-INFINI	INFINI	0.48	-INFINI	0.30	0.30	0.00	-INFINI	0.30	-INFINI
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
I	0.12	0.60	-INFINI	0.12	0.60	-0.09	0	INFINI	INFINI	-0.10	0.00	-INFINI
TOTAL	-0.45	-INFINI	-INFINI	INFINI	0.36	-INFINI	0.68	INFINI	INFINI	-INFINI	0.37	-INFINI

ensuite avec l'anticorps secondaire anti-souris (1:100). L'incubation avec un réactif Cy3 a permis de détecter l'anticorps. Les myoblastes provenant des biopsies (patients 6, 7 et 11) ont été mis en culture dans un milieu complet SKBM (Cambrex East Rutherford, NJ) avec 10% de sérum bovin dans un incubateur contenant 5%CO₂ et à 37°C. Les cellules en croissance dans une plaque 24 puits ont été traitées avec de l'acide L-ascorbique (0,25mM) cinq jours avant la fixation à la paraformaldehyde 4%. La membrane cellulaire a été perméabilisée avec du méthanol froid et la réaction fut bloquée avec du PBS-BSA 3% pour 30 minutes. Les échantillons ont été incubés avec un anticorps anti-collagène VI (MAB 3303, MAB1944) (Chemicon, Temecula, CA) (1 :100) pour une heure et ensuite avec l'anticorps secondaire anti-souris (1 :200) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Tous les échantillons ont été incubés avec une solution Hoestch (Molecular probe, OR) pour la détection des noyaux.

L'exclusion des loci par analyse de liaison a été effectuée en utilisant la séquence des amorces provenant des maps génétique deCODE et Marshfield (UCSC <http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). Les réactions PCR ont été effectuées avec 40ng d'ADN pour un volume total de 10µL contenant 1X tampon PCR, 3nM MgCl₂, 10µM d'amorces et 0.4U Taq polymérase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Les conditions d'amplification ont été obtenues de Genome database (www.gdb.org). Avant le chargement des produits sur un gel d'acrylamide 6% contenant 6M d'urée, 4µL de solution STOP et une dénaturation de 7 minutes à 95°C ont été effectués. L'acquisition des données a été effectuée sur un LiCOR 4100 avec le logiciel BasemagIR v.4.0 (LiCOR, ON, Canada). L'analyse des valeurs de LOD a été effectuée avec FASTLINK v.2.0.

L'analyse des mutations répertoriées dans la littérature et le génotypage par polymorphismes (SNP) ont été effectués par séquençage direct. Pour le séquençage du gène COL6A3, l'ARN a été isolé des myoblastes par Tryzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La réaction a été effectuée avec l'enzyme M-MLV (Invitrogen Carlsbad, CA) afin d'obtenir cinq fragments chevauchant. Les amorces utilisées sont les suivantes:

5'CAGGGGCTTCATTTCCGCACAG3',

5'CGCCGGGACGACCACCTCAT3',

5'CTGGTCCCCTGCTCTCCCTCAAAG3',

5'CCGCCACTGGGGGTCTAAC3', et

5'GGTCCCAACGGTGCACATAGATTAA3'. Le cDNA a par la suite été utilisé pour les réactions PCR. Les amplicons ont été envoyés au centre d'innovation génome Québec pour le séquençage. Les polymorphismes détectés dans le séquençage du cDNA de COL6A3 ont été confirmés par séquençage de l'ADN génomique. Afin de confirmer ces résultats de nouvelles amorces ont été dessinés avec PrimerSelect 4.03 (DNASTAR) et synthétisés par Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Les séquences ont été analysées avec Seqman 4.03 (DNASTAR, Wisconsin) et Chromas 1.62 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

3.4 Conclusion sur l'exclusion de loci candidats

Avant notre étude, le phénotype de dystrophie musculaire avec hyperlaxité a été très largement associé avec l'UCMD et à un moindre degré avec BM. Pour cette raison, l'exclusion des trois gènes codant les sous unités du collagène VI était nécessaire. L'étude

d'immunohistochimie combinée avec une étude génétique complète nous a permis d'exclure hors de tout doute ces gènes. Cette exclusion vient appuyer les quelques publications qui ont décrit des cas avec aucune déficience de la protéine et aucune mutation dans les gènes COL6A1, COL6A2 et COL6A3^{1,24,40,55}. Nous sommes les premiers à décrire une cohorte contenant plusieurs familles d'une même origine ethnique non liées au loci du collagène VI. Récemment, un groupe européen a décrit des familles d'origine pakistanaise et caucasienne non liées au loci du collagène VI²⁴. Les résultats d'exclusion que nous avons obtenu ainsi que les autres groupes démontrent l'hétérogénéité clinique et génétique du phénotype et par ce fait même l'existence de d'autres gènes causant un phénotype de CMD avec hyperlaxité. Suite à cette analyse, nous en sommes venu à l'hypothèse que le gène responsable de ce phénotype dans notre cohorte se trouvait sur un autre locus.



Chapitre 4

*Article: A new form of
congenital muscular
dystrophy with hyperlaxity
maps to 3p23-21.3*

4 **Introduction de l'article: A New Form of Congenital Muscular Dystrophy with Joint Hyperlaxity Maps to 3p23-21.3.**

Nouvelles hypothèses du projet :

1. Identifier par criblage du génome le locus responsable de cette nouvelle maladie.
2. Effectuer un criblage fin du génome afin de diminuer l'intervalle candidat.
3. Identifier le gène et les mutations responsables de la maladie.

Revenu à la case départ, nous avons entrepris un criblage entier du génome (GWS) afin d'identifier des nouveaux loci d'intérêt. Le GWS a été effectué par deCODE Genetics (Reykjavik, Iceland). Nous avons choisi d'envoyer l'ADN de nos deux familles les plus informatives, soit la famille G et I (Figure 6). L'échantillonnage comprenait dix individus, dont cinq atteints. La famille G était intéressante pour ce type d'étude, puisqu'elle possède trois enfants atteints ce qui au niveau du calcul des valeurs de LOD nous donne beaucoup de puissance. La famille I est elle aussi très informative. Cette famille de trois enfants, dont deux atteints, est consanguine au troisième degré, ce qui confère énormément de puissance au calcul des valeurs de LOD score. Pour cette famille nous s'attendions aussi à une grande homozygotie au locus d'intérêt. Lors de l'analyse des résultats du GWS nous avons obtenu pour quatre loci une valeur de LOD en multipoint (Annexe 3) supérieure à 1. Le locus qui nous semblait le plus intéressant se trouvait sur le chromosome 3 avec une valeur de LOD de 2.5 (Figure 7). De plus, la famille I était homozygote pour les allèles de six marqueurs consécutifs couvrant une distance de

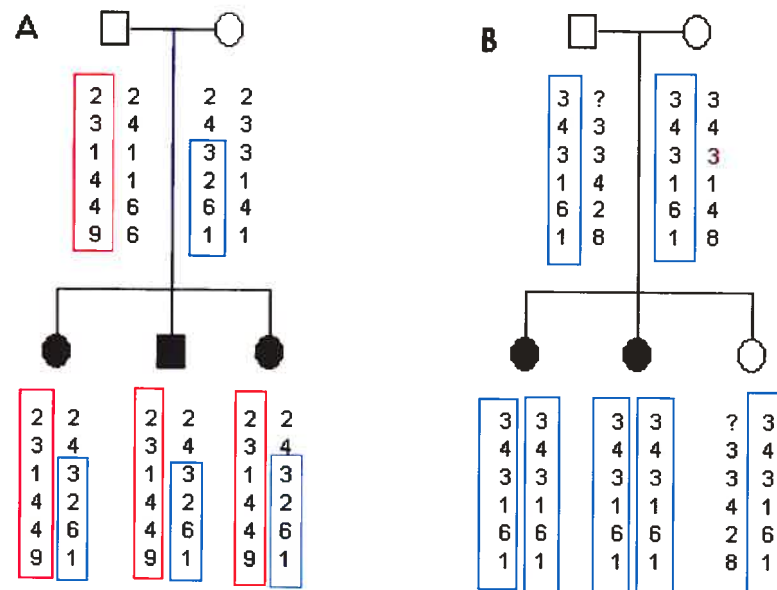


Figure 6 : Résultats des haplotypes de la région positive du chromosome 3 pour les familles G et I. **A)** Famille G, hétérozygote pour deux chromosomes (encadré rouge et bleu) et **B)** Famille I, homozygote (encadré bleu).

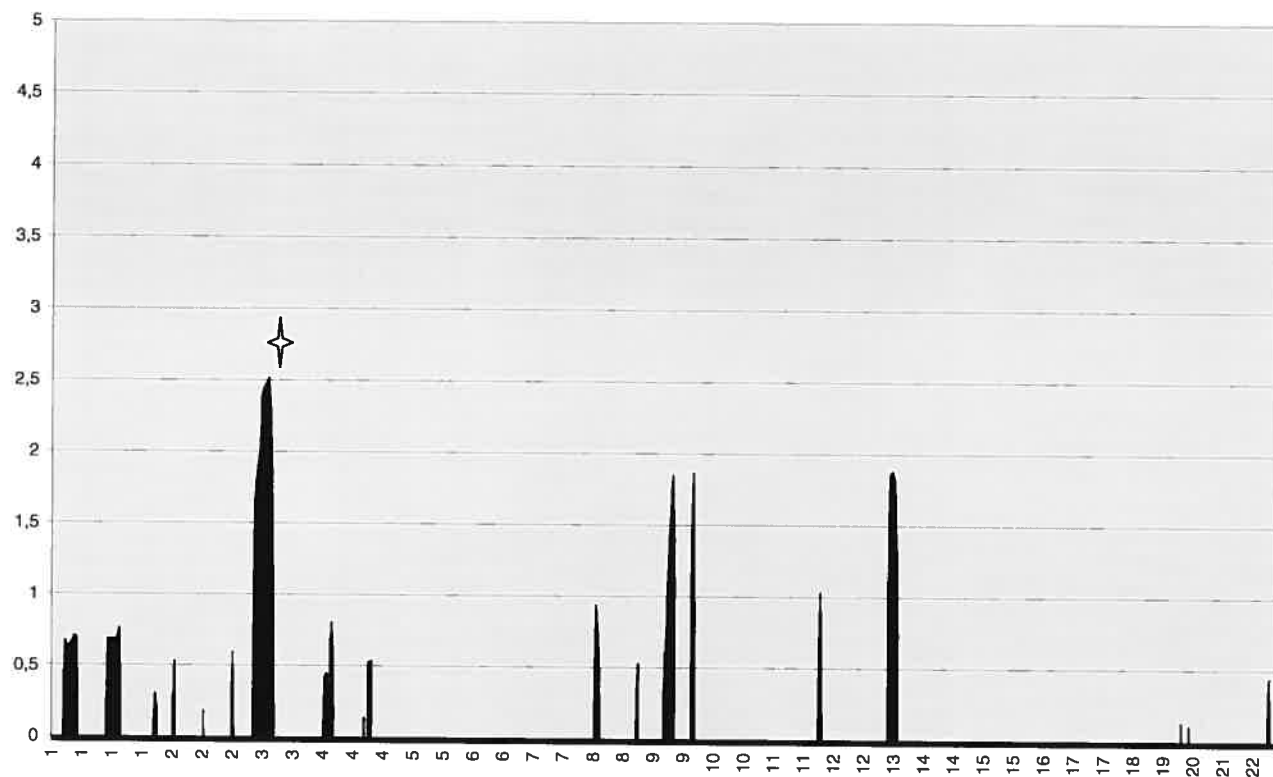


Figure 7 : Résultats du GWS pour les 22 chromosomes. Valeurs de LOD scores en multipoint calculées avec logiciel MAXPROB de Genehunter. Locus sur le chromosome 3 avec une valeur de LOD de 2.5 (★).

32cM (Figure 6). La famille G était hétérozygote à ce locus, mais partageait l'un de ses chromosomes avec la famille I. Dans ce cas, la famille G posséderait deux mutations différentes dont l'une est la même que celle retrouvée dans la famille I. Avec ces résultats encourageants, nous avons entrepris un criblage fin de la région avec toutes les familles recrutées pour l'étude. Ces résultats ainsi qu'une description clinique plus exhaustive sont présentés dans l'article qui suit.

4.1 Contributions des co-auteurs

Martine Tetreault : Exclusion du collagène VI par des études d'immunochimie sur les myoblastes en culture. Exclusion des trois loci du collagène VI par analyse de liaison avec le logiciel Linkage v.2.0. Exclusion du gène COL6A3 par séquençage du cDNA. Analyse du GWS avec le logiciel Genhunter v.2.1. Criblage fin du génome avec des marqueurs microsatellites et analyse avec Genhunter v.2.1. Rédaction du manuscrit.

Antoine Duquette : Examen clinique de certains patients de la cohorte. Révision du manuscrit.

Isabelle Thiffault : Participation aux analyses et élaboration des protocoles de Genhunter et Linkage. Révision du manuscrit.

Claude Bherer : Reconstruction généalogique de la famille I. Révision du manuscrit.

Jonathan Jarry : Élaboration du protocole Genhunter. Révision du manuscrit.

Lina Loisel : Infirmière de recherche responsable du recrutement des participants.

Brenda Banwell : Recrutement de patients. Révision du manuscrit.

Guy D'Anjou : Évaluation neurologique de certains patients. Révision du manuscrit.

Jean Mathieu : Évaluation neurologique de certains patients. Révision du manuscrit.

Yves Robitaille : Évaluation pathologique de biopsies musculaires. Révision du manuscrit.

George Karpati : Biopsies musculaires et évaluation pathologique de certains patients. Révision du manuscrit.

Michel Vanasse : Évaluation neurologique de certains patients. Révision du manuscrit.

Bernard Brais : Évaluation neurologique de tous les patients. Vérification de tous les résultats de l'étude. Rédaction du manuscrit.

4.2 **Article : A New Congenital Muscular Dystrophy with Joint Hyperlaxity Maps to 3p23-21.3**

A new form of congenital muscular dystrophy with joint hyperlaxity maps to 3p23-21.

M. Tetreault¹, A. Duquette¹, I. Thiffault¹, C. Bherer^{1, 2}, J. Jarry¹, L. Loisel¹, B. Banwell³, G. D'Anjou⁴, J. Mathieu⁵, Y. Robitaille⁶, G. Karpati⁷, M. Vanasse⁴, B. Brais^{1, 4, 5}

¹ Laboratoire de neurogénétique, Center for the study of brain diseases, Centre de recherche du CHUM, Montréal, QC, Canada

² Démographie et épidémiologie génétique, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, Québec, Canada

³ Division of Neurology, the Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada

⁴ Clinique des maladies neuromusculaires, Centre de réadaptation Marie-Enfant, Hôpital Sainte-Justine Hospital, Montréal, Québec, Canada

⁵ Clinique des maladies neuromusculaires, Carrefour de Santé de Jonquière, Saguenay, Québec, Canada

⁶ Département de pathologie, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Québec, Canada

⁷ Montreal Neurological Institutes, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

ABSTRACT

Congenital muscular dystrophies (CMD) are a heterogeneous group of disorders. A growing number of CMD have been found to be associated with joint hyperlaxity. We recruited 14 French-Canadian cases belonging to 11 families affected by a novel autosomal recessive congenital muscular dystrophy with hyperlaxity (CMDH). **Methods:** Extensive neurological examination, genome-wide scan and genetic mapping analyses were used to define its phenotype and uncover its novel chromosomal locus. **Results:** All cases come from the southwestern part of Quebec, suggesting a new French-Canadian founder effect. All patients present muscle weakness, proximal contractures coexisting with distal joint hyperlaxity. Pathological and genetic studies have excluded that mutations in the three genes coding for collagen VI subunits are responsible for this disease. A genome-wide-scan established linkage of two CMDH families to a region on chromosome 3p23-21.3. Further linkage analysis confirmed that all families are linked to the same region (LOD score of 5.3). Haplotype analysis defines a 5cM candidate interval and suggests that two common mutations may account for 78% of carrier chromosomes. **Interpretation:** This study describes and maps a new form of recessive CMD with joint hyperlaxity distinct from Ullrich and Bethlem myopathies with a founder effect in the French-Canadian population.

Introduction

Congenital muscular dystrophies (CMD) form of a heterogeneous group of disorders characterized by congenital hypotonia, muscular weakness, joint contractures and myopathic or dystrophic changes on muscle pathology²³. To date the combination of contractures and distal joint hyperlaxity has been observed mostly in Ullrich CMD and to a lesser extent in Bethlem myopathy²³. In genetically proven cases of Ullrich CMD (UCMD) hypotonia, hip dislocation, delayed motor milestones, protruded calcaneus and early respiratory failure are usually observed. Some of the less severe UCMD cases may learn to walk but they will lose the ability in their first decade of life¹. In the milder autosomal dominant Bethlem myopathy (BM) joint hyperlaxity is only a minor feature²³. These two conditions were found to be allelic with mutations in the genes coding for the three subunits of collagen VI: COL6A1/A2 on chromosome 21q22.3 and COL6A3 on chromosome 2q37²³. The collagen VI protein is a major component of the extracellular matrix²³. Complete loss or reduction of collagen VI due to collagen VI gene mutations has been associated with these disorders⁴⁰. Over 60 different mutations in all three subunits have been reported in previous studies²³. Recently, cases of congenital muscular dystrophy with joint hyperlaxity with preservation of collagen VI in muscle and absence of COL6A1, A2 or A3 mutations have been described^{1,24,40,55}. These observations have led some to suggest that other CMD with hyperlaxity, distinct from UCMD or BM, have yet to be described and their mutated genes identified^{1,24,40,55}. This paper describes a group of French-Canadian cases suffering from a novel CMD with joint hyperlaxity with a milder phenotype than UCMD. This relatively homogenous cohort further allowed the mapping of the mutated gene to chromosome 3p23-21.3.

Subjects and methods

Clinical evaluation and DNA isolation

We have identified 14 affected individuals from 11 different Quebec kindreds (Figure 1) presenting a phenotype resembling UCMD. All probands and family members underwent a detailed neurological examination by experienced neurologists. This project was approved by institutional Ethics Committee of the Centre de recherche du CHUM. Informed consent was obtained from all patients and all participating living family members. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using a standard method.

Collagen VI genes exclusion by immunohistochemistry, linkage and sequencing

Muscle biopsies were performed using standard techniques on three patients (patients 6, 7 and 11). Standard histochemistry and immunohistochemistry was performed using the 5C6 anti-collagen VI antibody (Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa)⁴¹. The human muscle for the immunolocalization of collagen VI was purified in acetone and then washed in PBS. The tissues were incubated with the 5C6 anti-collagen VI diluted 1:20 for an hour and then with an anti-mouse diluted 1:100 as secondary antibody for an hour. Thirty minutes incubation with a Cy3 reagent followed to detect bound antibody. Primary myoblasts were grown from deltoid biopsy samples of patients 6 (family F), 7 (family G) and 11 (family I) in SKBM complete medium (Cambrex, East Rutherford, New Jersey) with 10% fetal bovine serum in

5% CO₂ at 37°C. Culture muscle myoblasts from patients and controls were grown in 24-well chambers on glass slides and were treated with 0.25mM L-ascorbic acid for 5 days. Samples were fixed with cold paraformaldehyde 4% at room temperature for 10 minutes. The cell membranes were permeabilized with cold methanol and then blocked for 30 minutes in PBS-BSA 3%. The samples were incubated with anti-collagen VI monoclonal antibodies (MAB3303, MAB1944) (Chemicon, Temecula, CA, USA) diluted 1:100 in PBS containing 3% BSA for one hour at room temperature. Then the samples were incubated with an anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) diluted 1:200 in PBS 0.05% Tween for 45 minutes. All the samples were incubated 10 minutes with a Hoescht solution (Molecular probe, OR, USA) for nuclear labeling.

The linkage exclusion of the three collagen VI genes was performed using primer sequences of polymorphic markers obtained from deCODE and Marshfield genetic maps (UCSC (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). PCR reactions were performed using 40ng genomic DNA in 10µL PCR reactions containing 1XPCR reaction buffer, 3nM MgCl₂, 10µM primer mix, and 0.4 U taq DNA polymerase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Amplification conditions were obtained from the Genome database (www.gdb.org). PCR products sizing were performed by adding 4µL of STOP loading buffer to each sample, followed by a denaturing step for 7 minutes at 95°C and the loading of 2µL onto a 64-lane 6% acrylamide gel containing 6M urea. Data acquisition and analyses was achieved on the LiCOR 4100 automated DNA sequencer using BaselmagIR v.4.0 software (LI-COR, ON, Canada). Two-point linkage analysis was performed using FASTLINK v. 2.0.

Screening of reported mutations in the three collagen VI genes and SNPs genotyping was performed by genomic sequencing of exons. Sequencing of COL6A3 was performed as follows: total RNA was isolated from myoblasts using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California). The samples were treated with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California) to obtain 5 overlapping cDNAs. The specific primers used for the RT-PCR were: 5'CAGGGGCTTCATTTCCGCACAG3', 5'CGCCGGGACGACCACCTCAT3', 5'CTGGTCCCCTGCTCTCCCTCAAAG3', 5'CCGCCACTGGGGGTCTAAC3', and 5'GGTCCCAACGGTGCACATAGATTA3'. The resulting cDNAs were used as a template for PCR amplification of the entire coding region of COL6A3 mRNA transcripts with Amplitaq polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California). RT-PCR products were sequenced on both strands at the Genome Quebec Innovation Center, McGill University. Polymorphisms were confirmed on genomic DNA of the entire cohort by amplification and direct sequencing of the specific regions. Fragments were amplified using the same amplification mix as for genotyping. PCR primers were designed using PrimerSelect 4.03 (DNASTAR) and synthesized by Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Sequences were aligned using SeqMan 4.03 (DNASTar, Wisconsin, USA) and analyzed using Chromas 1.62 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Genome Scan and linkage analysis

A genome wide scan with 500 markers was conducted at deCODE Genetics (Reykjavik, Iceland) on ten participants from families G and I for the identification of a new locus. Fine mapping was performed by typing microsatellite markers from the region (<http://genome.ucsc.edu>,

May 2004 assembly). PCR reaction was performed as described for collagen VI genes. Multipoint linkage analysis was performed using GENEHUNTER v.2.1. Marker order and genetic distances were based on the deCODE genetic map and UCSC physical map (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). For the linkage analyses allele frequencies were assumed to be equal. The CMDH phenotype was analyzed as an autosomal recessive trait with 100% penetrance and with an estimate disease gene frequency of 0.001. No phenocopies were incorporated into the analysis.

Results

The French-Canadian CMDH cluster

A total of 14 patients belonging to 11 families with a phenotype resembling a milder form of Ullrich CMD were recruited (Figure 1). Based on the review of the 36 French-Canadian cases of congenital muscular dystrophy followed at the Neuromuscular clinic of the Marie-Enfant Rehabilitation Center of the Sainte-Justine Hospital in Montreal during the past 20 years, this new CMDH phenotype would account for 45% of all cases. Therefore, CMDH would be the most frequent CMD in French-Canadians, which strongly suggests the existence of a founder effect for CMDH mutations in this population. All recruited families come from the southwestern part of the Province of Quebec further supporting the presence of a regional founder effect. This cohort is the first to demonstrate a founder effect in a form of CMD. Segregation in pedigrees strongly suggests an autosomal recessive mode of inheritance (Figure 1). None of the parents have a muscular dystrophy, though many have distal joint laxity. Furthermore, the child of case 11 (family I) is not

affected. Only the parents of family I are consanguineous (i.e. third degree cousins).

The initial recruitment was performed thinking that they were cases of Ullrich CMD. Therefore, the UCMD GENRE clinical features were assessed in all cases^{56,57}. All were hypotonic with contractures at birth. They demonstrated a generalized slowly progressive muscle weakness accompanied by distal joint laxity and proximal contractures (Table 1). Joints laxity is mainly observed at the fingers (93%), wrists (43%) and toes (43%). In our cohort, we also observed proximal laxity of the elbows in some patients (43%). The contractures are mostly present at the ankle (71%), knee (21%) and shoulder (21%) (Figure 2, A-D). Rigidity of the spine was not observed, while important cervical spine hypermobility is frequently observed. A long myopathic face is rarely observed (Figure 2A). Intelligence is normal or only mildly impaired. Creatine phosphokinase (CPK) levels are normal to mildly elevated (range 17-959U/L). Pulmonary vital capacities in our cohort was usually diminished on average by 50% (range 21-100%), but seemed to be stable through decades. This likely explains the prolonged life expectancy. Unlike in UCMD and many other CMD described to date³, in CMDH respiratory failure appears not to be a problem despite the usual abnormal pulmonary function. All cases learned to walk between 14 months and three years of age (Table 1). Three of our patients became wheelchair-bound: patient 2 (family B) at the age of 10, patient 6 (family F) at the age of 28 and patient 11 (family I) at the age of 32. The latter followed a car accident and a prolonged period in an intensive care bed during which she developed severe proximal contractures of the hips and lumbo-sacral spine. Scoliosis, though a frequent feature (64%), is not found in all cases and varies from mild to severe. Of the 11 cases older

than 18 only 2 (14%) were operated for their scoliosis. Other distinctive features from UCMD are the absence of high arched palate, torticollis or protruded calcaneus (Figure 2B). Together the shared clinical features of these cases define a new type of CMD with joint hyperlaxity distinct from other recessive CMD and milder than molecularly confirmed cases of Ullrich CMD.

Absence of deficiency or mutations of collagen VI

Most cases of recessive CMD associated with distal joint hyperlaxity have been found to be caused by recessive mutations, rarely dominant mutations^{3,25,58}, in one of the three genes coding for the subunits of collagen VI²³. These patients have been diagnosed as affected by Ullrich CMD. However, cases with overlapping phenotypes have clearly been described as not being caused by mutations in these genes^{1,24,40,55}. Since the initial presumptive diagnosis of our cases was UCMD, we studied the presence of collagen VI on muscle biopsies, completed linkage analyses and search for COLVI mutations. In mutation-proven UCMD cases, a complete or partial deficiency of the collagen VI protein is observed in muscle²³. The review of pathological reports on previous muscle biopsies on all our cases only confirmed the constant presence of muscular abnormalities. To better characterize our cohort, cases 6 from family F and two belonging to the most informative families (case 7 from family G and 11 from family I) had new deltoid biopsies. All biopsies showed variation in fiber sizes, frequent central nuclei, little or no inflammatory infiltrate, increased interstitial connective tissue and abundant collagen VI immuno reactivity using the 5C6 antibody. No other specific abnormality was shared by the three biopsies. Presence of collagen VI was also observed by immunostaining of cultured

myoblasts from the same three patients (Figure 2E-F). None of the mutations previously reported in the genes coding for the three subunits of collagen VI were uncovered by genomic sequencing of all cases. Genotyping analysis of microsatellite markers flanking the COL6A1 and COL6A2 genes located on chromosome 21 was performed. Linkage of our families to these markers was excluded (LOD score ≤ -2 for markers D21S1255, D21S1893 and one intragenic marker to COL6A2, data not shown). Linkage analysis with markers in close proximity to the COL6A3 gene did not allow such exclusion. We therefore decided to sequence the entire coding region of this gene. The sequencing by RTPCR of the entire gene from three of our cases did not uncover any mutations (patients 6, 7 and 11). Together these results suggest that our cases share a distinct milder CMD with joint hyperlaxity phenotype that is caused by mutations in another gene.

Mapping of the CMDH locus

Ten DNA samples from affected and unaffected participants belonging to two unrelated CMDH families (family G and I) were sent to deCODE genetics (Reykjavik, Iceland) for a Genome-Wide scan (GWS). Genealogical data confirmed that parents in family I were third-degree cousins, thereby increasing the odds that cases 11 and 12 be homozygous at the disease locus. Genotypes were generated for 500 polymorphic microsatellites markers separated on average by 7cM. Multipoint autosomal recessive parametric linkage was computed using Genehunter v.2.1. Haplotypes were reconstructed in a single section using the MAXPROB method of Genehunter v.2.1. The resulting haplotypes were imported in Cyrillic v.2.0. Multipoint LOD scores greater

than 2 was obtained for one locus. A multipoint LOD score of 2.5 was obtained at that locus. The allele homozygosity for 6 markers between D3S2385 and D3S3521 (32cM) observed for the two cases of family I further supported this locus. Genotyping of the entire 11 families with 40 polymorphic markers, spanning 34cM (38Mb) confirmed linkage of these to a 5cM (6Mb) region on chromosome 3p23-21.3 (D3S1468-D3S3522). Maximum multipoint LOD score value of 5.3 was obtained for marker D3S2417 (Figure 3A). As shown on figure 3B, allele and haplotype sharing suggest that few CMDH mutation-carrying chromosomes are present in our cohort, two more common which explain 78% of the chromosome. Our recent experience of the study of rarer French-Canadian regional founder effect diseases suggests that we should expect more than one mutation^{59,60}. By looking at the more common chromosome, the haplotype analysis suggests five putative historical recombinations at marker D3S3639, making marker D3S3639 the centromeric flanking marker (Figure 3B). On the telomeric side, we observed for the same common chromosome three putative ancestral recombinations at marker D3S1611. This marker becomes the telomeric flanking marker. This defines a 1.6cM (1.3Mb) candidate interval based on the Marshfield genetic map and UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) (Figure 3B).

CONCLUSION

CMDH: a disorder distinct from UCMD

This paper describes a cohort of French-Canadian patients with a novel recessive congenital muscular dystrophy with joint hyperlaxity (CMDH)

with clinical overlap with UCMD. All the described cases clearly have a different and milder CMD phenotype than classical UCMD. They share with UCMD the presence of congenital hypotonia, weakness, contractures, distal joint hyperlaxity, scoliosis, normal intelligence and frequent delayed motor milestones³. However, certain clinical features are clearly different from UCMD: their strength is better preserved, they may have concomitant distal and proximal hyperlaxity, they do not have protruding calcani, they all acquire the ability to walk, most continue to walk in adulthood and they do not develop respiratory failure. The apparent stability of their pulmonary function, despite their frequent scoliosis, probably explains in large part their prolonged life expectancy. The oldest, case 2, now aged 40 can still stand from her wheelchair and walk a few steps. The recessive mode of transmission and the more severe phenotype of the CMDH patients help distinguish it from Bethlem myopathy²³. The absence of rigid spine on examination or need for assisted ventilation tells it apart from Rigid Spine Syndrome¹. The normal intelligence and absence of central nervous pathology help distinguish it from the numerous other forms of CMD associated with mental retardation such as merosin deficient or Fukuyama CMD. The absence of skin hyperelasticity or other skin abnormality combined to the predominant muscle weakness excludes the diagnoses of connective tissue disorders such as Ehlers-Danlos or Marfan syndromes²³. A growing number of cases of CMD with UCMD-like phenotypes, preservation of collagen VI in muscle and absence collagen VI subunit mutations are being reported^{1,24,40,55}. Most of these cases have more severe phenotypes than the French-Canadian cases described in this paper. They may have protruding calcani⁴⁰, many never achieve independent ambulation^{1,40}, some have severe restricted respiratory function^{24,55}, short stature²⁶ or intellectual impairment²⁶. However, some

older cases with positive collagen VI staining appear to have a milder form of CMD very reminiscent of CMDH¹. The shared French-Canadian background of our patients further supports that they are affected by a new form of CMD with a founder effect in this population which is well known for the higher prevalence of certain recessive disorders⁶¹. The mapping of our families to an original chromosome 3p23-21.3 locus not previously associated with a muscular dystrophy further supports that CMDH is a distinct form of the growing number of CMD associated with joint hyperlaxity.

CMDH's 3p23-21.3 candidate region

Though more than 40 genes are present in the large 5cM (6Mb) CMDH critical region, three stand out as excellent candidates: ITGA9, LAMR1 and ACVR2B. ITGA9 and ACVR2B lie in the smaller haplotype defined 1.6cM CMDH region. All three genes could be involved in normal extracellular matrix and basal lamina integrity. The most promising candidate is the integrin-alpha 9 protein (ITGA9) gene. Integrins are known to mediate cell-cell and cell-matrix adhesion⁶². ITGA9 is highly expressed in lung and muscle and forms heterodimers with integrin beta 1 (ITGB1)⁶³. ITGB1 bound to integrin alpha 7 (ITGA7) in the basal lamina to form the major myofiber transmembrane receptor for the laminin alpha 2 chain of merosin⁶⁴. Mutations in laminin alpha 2 are frequent causes of congenital muscular dystrophy^{65,66}. Hayashi et al. screened a large group of muscle biopsies on CMD cases and identified three with absent ITGA7 staining⁵¹. All cases were carriers of recessive ITGA7 mutations. The myopathic features of the human muscle was similar to the ones observed in mice knock-out for ITGA7, though it should be pointed out that mice did not have clinical symptoms⁶⁴. Unfortunately,

the clinical description of the original ITGA7 cases is limited and no other mutation-proven cases have since been reported⁵¹. None of the three cases were said to have joint hyperlaxity. Mutations in ITGA9 could interfere with normal basal lamina function and lead to abnormal anchorage to the interstitium as was observed in Japanese Ullrich-like cases with no collagen VI mutations⁴⁰. Another candidate is the laminin receptor 1 (LAMR1) a member of the large extracellular matrix glycoproteins. The heterodimeric structure is similar to other extracellular matrix receptors like fibronectin and vitronectin⁶⁷. The activin A IIB receptor (ACVR2B), a dimeric growth and differentiation factor which belong to the transforming growth factor beta (TGF β) superfamily, is also a promising candidate. The expression of TGF β is known to be dysregulated in Marfan syndrome cases and the TGF β R2 gene is mutated in the Marfan syndrome type II^{34,68}. Joint hyperlaxity is observed in these diseases making ACVR2B gene an interesting candidate for CMDH. Further narrowing of the candidate interval by the recruitment of other families will help pinpoint the CMDH gene.

In this report, we describe the clinical features and mapping of a large French-Canadian cohort affected by a novel autosomal recessive congenital muscular dystrophy with hyperlaxity (CMDH). Mutation in the CMDH gene may also be found in some of the growing number of cases with an Ullrich-like phenotype that do not carry mutations in the collagen 6 genes. CMDH expands the growing spectrum of congenital muscular dystrophies associated with joint hyperlaxity. In some populations such as in French-Canadians CMDH, may explain a large proportion of CMD cases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank all family members for their participation. We would also like to thank for their collaboration: Marie-Pierre Dubé, Elsa Rossignol, Francine Lachance, Sylvie D'Arcy, Johanne Bégin, Carmen Tremblay, Nadine Leclerc and Charlotte Côté. This work was supported by grants to B.B. from the Muscular Dystrophy Association of Canada and the Muscular Dystrophy Association. B.B is scholar from the Fonds de la Recherche en Santé Québec (FRSQ).

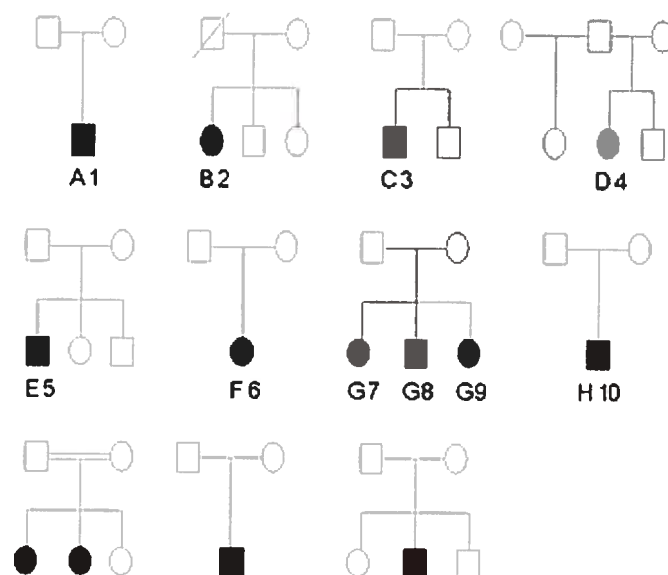


Figure 1: Pedigrees of the CMDH cohort. We identified 14 patients (seven males and seven females) belonging to 11 families. Parents of patient 11 and 12 (family I) are third degree cousins.



Figure 2: Clinical features and collagen VI immunohistochemistry on muscle and myoblasts. A) Severe scoliosis (patient 4 family D). B) Ankle and toes contractures (patient 6 family F). C) Wrist hyperlaxity (patient 6 family F). D) Fingers hyperlaxity (patient 6 family F). E) Histopathology on muscle (patient 11 family T). F) Collagen VI protein immunostaining on muscle tissue from (patient 11 family D).

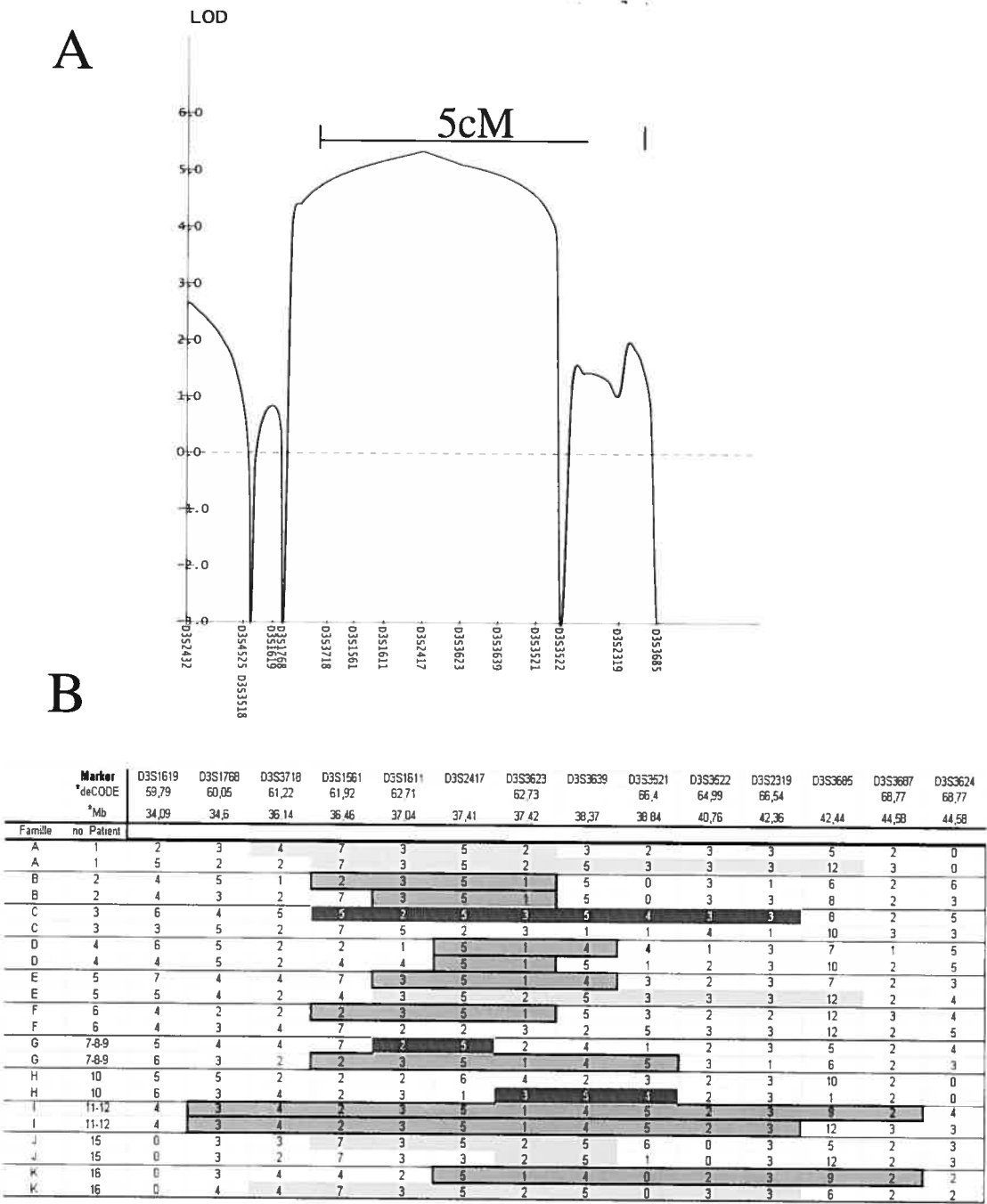


Figure 3: Linkage and haplotype analyses **A)** Multipoint LOD scores for chromosomes 3 markers defining a 5cM candidate interval (maximum LOD score of 5.3). **B)** Haplotype results of CMDH carrier chromosomes in 11 CMDH families. Two intervals are defined: the 5cM-region represents the conservative linkage-base CMDH interval (A) and a 1.6cM interval defined by four putative centromeric for the carrier chromosomes with the common haplotype and by three putative telomeric historical recombination . * Base on UCSC <http://genome.ucsc.edu>

Table 1: Clinical variables on 14 French-Canadian CMDH patients.

Case number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Family	A	B	C	D	E	F	G	G	G	H	I	I	J	K
Sexe	male	female	male	female	male	female	female	male	female	male	female	female	male	male
Age at diagnosis	2	4	6	3	6	1	5	5	5	3	4	2	0	7
Age in 2005	16	40	28	29	18	22	24	17	19	10	39	24	19	35
Distal laxity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Contractures	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CNS involvement	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scoliosis	++	++	++	++	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Ability to walk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lost ability to walk (age)	-	28	-	-	-	10	-	-	-	-	32	-	-	-
Abnormal pulm. f.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
%VC at age	30	59	50	93	69	21	53	77	66	100	63	86	38	-

VC: Vital capacity; blank: Not tested; 0 = birth

4.3 Conclusion de l'article

L'étude présentée dans cet article est d'une grande importance dans le champ des dystrophies musculaires congénitales. Depuis déjà quelques années, l'existence d'une hétérogénéité phénotypique et génétique dans les cas diagnostiqués UCMD est connue de la communauté scientifique. Plusieurs groupes ont identifié des patients avec un phénotype de CMD combiné à de l'hyperlaxité possédant aucune déficience de la protéine collagène VI et aucune mutation dans l'un des trois gènes codant pour les sous unités de cette protéine^{1,24,40,55}. Tout de fois, nous sommes les premiers à décrire une large cohorte de 11 familles non liées aux loci de l'UCMD et à établir le nouveau locus associé à ce phénotype. La région 3p23-21.3 semble expliquer la majorité des cas de CMD avec hyperlaxité au Québec et pourrait probablement expliquer d'autres cas « UCMD-like » dans d'autres populations.



Chapitre 5

Discussion

5 Discussion

5.1 Conclusion du projet

5.1.1 Particularités cliniques de cette nouvelle forme de CMD avec hyperlaxité

Nous devons retenir de cette étude que sous des traits phénotypiques très similaires, on peut retrouver plus d'une maladie. La majorité des patients recrutés pour notre étude avaient à prime abord été diagnostiqués comme étant atteints de l'UCMD. Ce qui nous semblait à première vue une légère variation du même phénotype c'est en fait avéré être des traits indicatifs d'une nouvelle maladie. De façon générale, les patients de notre cohorte semblaient présenter une atteinte plus légère de la maladie comparativement au cas UCMD décrit dans de la littérature. Une des caractéristiques les plus frappantes illustrant le côté plus modéré du phénotype est la préservation tardive de l'ambulation de nos patients. L'habileté d'apprendre à marcher semble être dans les cas d'UCMD plutôt l'exception et non la règle due à leur grande faiblesse musculaire²³. Ceux qui acquièrent cette capacité vont rapidement la perdre. Dans notre cohorte, la capacité de marche a été atteinte pour tous les patients de la cohorte (14 individus affectés) avec tout de même un retard moteur (entre 14 mois et 3 ans). Cette différence peut être expliquée par une force musculaire accrue chez les patients canadien-français comparativement au cas d'UCMD. L'autre différence majeure entre les patients CMDH et UCMD est l'absence de détérioration importante de la fonction respiratoire. Malgré la présence fréquente de scoliose dans notre cohorte (64%) les fonctions pulmonaires sont beaucoup moins diminuées. Le pourcentage

moyen de la capacité vitale chez nos patients est de 50%, mais lorsque la mesure est prise sur plusieurs années nous n'observons aucune variation significative de cette variable. Ceci confère une espérance de vie accrue pour les patients CMDH. Nous avons dans notre cohorte des patients dans leur quatrième décennie de vie, tandis que les cas UCMD décède dans la première ou deuxième décennie dû à leur insuffisance respiratoire²⁴. Nous démontrons par cette étude qu'il existe plusieurs CMD avec hyperlaxité ligamentaire. Une confirmation du diagnostic par des tests pathologiques et génétiques sera de plus en plus nécessaire afin de distinguer les diverses formes de CMD avec hyperlaxité.

5.1.2 Phénotype chez les parents

Il est intéressant de noter que nous avons observé que les parents des individus atteints de notre cohorte ne sont pas complètement asymptomatiques. La ségrégation de la maladie dans nos familles démontre que CMDH est transmise sous le mode autosomique récessif. Afin d'appuyer ce fait, la patiente 11 (famille I) a eu un enfant qui ne semble pas avoir aucun symptôme de la maladie. Les parents des patients CMDH sont donc porteurs obligatoires. Lors des examens neurologiques et du recrutement des familles, nous avons observé que plusieurs des parents démontraient de l'hyperlaxité. Le phénotype des parents pourraient s'apparenter au syndrome d'instabilité familial des articulations où une élasticité des articulation est observée, mais sans d'atteinte musculaire. Aucune publication sur l'UCMD ou les autres syndromes démontrant de l'hyperlaxité n'a déjà mentionné cette observation. Le gène responsable de la maladie dans notre cohorte

semble donc très important au niveau de l'organisation musculo-tendineuse, puisque la présence d'un seul allèle muté confère une hyper-élasticité des articulations chez plusieurs de nos parents. Par contre, c'est la présence des deux allèles mutés qui cause l'atteinte musculaire et squelettique.

5.1.3 **Maladie à effet fondateur québécois**

Plusieurs maladies récessives à effet fondateur ont été décrites au Québec⁶¹. Une grande partie d'entre elles ont été décrite dans les régions du Saguenay-Lac St-Jean et du Charlevoix. Parmi les plus connues on retrouve l'ataxie spastique de Charlevoix Saguenay (ARSACS)⁶⁹, la fibrose kystique (CF)⁷⁰ et l'acidose lactique⁷¹. Plusieurs données sur notre cohorte viennent appuyer l'hypothèse que CMDH est un nouvel exemple de maladie récessive à effet fondateur québécois. Tous les patients de notre cohorte proviennent du sud-ouest de la province. Avec la ville de Montréal en son centre ainsi que la rive sud et la rive nord, on retrouve aux abords du fleuve St-Laurent des paroisses faisant parties des plus anciennes de la Nouvelle France. Cette région a tout d'abord été peuplée par les français lors du XVII et XVIII siècle. Cette région est maintenant l'une des plus populeuse du Québec et des plus hétérogène ce qui rend difficile l'identification de nouvelle maladie à effet fondateur. On retrouve tout de même dans la littérature des exemples d'effet fondateur du sud-ouest du Québec. L'un des premiers à avoir été décrit est la dysplasie hidrotique ectodermique de Clouston à transmission dominante^{61,72}. Le syndrome d'hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH)⁷³, la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)⁷⁴ et plus récemment la névrite sensitive

héréditaire de type II (HSAN II)⁶⁰ constituent d'autres maladies à effet fondateur dans cette région. Les résultats génétiques que nous avons obtenus appuient eux aussi la possibilité d'un effet fondateur. Dû à l'hétérogénéité génétique de cette région, nous nous attendons à avoir plus d'une mutation dans notre cohorte. En effet, nos haplotypes pour les chromosomes porteurs suggèrent qu'il existe cinq mutations distinctes dont les deux plus communes seraient partagées par 78% des chromosomes porteurs de notre cohorte. Ces données génétiques combinées à la distribution géographique des cas démontrent que CMDH est une nouvelle maladie à effet fondateur au Québec.

5.1.4 L'intervalle candidat

La grande taille de la cohorte ainsi que la présence d'un effet fondateur nous ont permis d'identifier son locus chromosomique. Avec nos 11 familles, dont l'une consanguine (famille I), incluant 14 individus atteints, nous avons une grande puissance pour les analyses génétiques (LOD score maximum de 5.3). Suite au criblage fin du génome, nous avons obtenu un intervalle conservateur d'une distance de 5cM. Dans cette grande région nous observons plus de 40 gènes, mais seulement trois d'entre eux ressortent comme de très bons candidats : l'intégrin alpha 9 (ITGA9), le récepteur laminin 1 (LAMR1) et le récepteur activin A IIB (ACVR2B). En tenant compte des haplotypes construits à partir des génotypes, nous arrivons à réduire notre intervalle à 1,6cM, soit la distance entre les marqueurs D3S1611 et D3S3639. Dans ce plus petit intervalle, nous retrouvons deux de nos gènes candidats soient ITGA9 et ACVR2B. Afin de définir le plus petit intervalle avec les haplotypes, nous avons seulement utilisé les chromosomes les plus communs. Dans ce

type d'analyse, il est important de demeurer conservateur et ainsi de ne pas diminuer trop vite notre intervalle afin de ne pas exclure le gène responsable de la maladie.

5.1.5 Patients canadiens-français non liés au locus sur le chromosome 3p23-21.3

*P*our cette étude, nous avons recruté des familles-canadiennes françaises provenant d'une région autre que le sud-ouest de la province. L'une de ces familles est originaire du Saguenay-Lac St-Jean. Le phénotype clinique des individus atteints de cette famille est ressemblant au cas d'UCMD et de CMDH. Par contre, ces patients ont acquis la capacité à la marche pour ensuite la perdre et la retrouver. Aucun cas similaire n'a été observé dans notre cohorte CMDH ni dans la littérature. Nous avons tout de même effectué des analyses génétiques pour vérifier la liaison de cette famille avec le locus 3p23-21.3. Nous avons testé une quarantaine de marqueurs microsatellites dans la région afin de construire leur haplotype. Nous avons calculé la valeur de LOD en multipoint avec Genhunter pour les génotypes obtenus. Une valeur significativement négative ($\text{LOD} \leq -2$) a été obtenue pour toute la région de 30cM. Avec ces résultats génétiques nous pouvons affirmer que cette famille n'est pas liée au locus 3p23-21.3. Étant donné que la famille originaire du Saguenay-Lac St-Jean ne lie pas le locus 3p23-21.3 ceci vient renforcer notre hypothèse d'effet fondateur du sud-ouest de la province et démontrer l'hétérogénéité du phénotype CMD avec hyperlaxité même au Québec.

5.2 Perspectives à venir

5.2.1 Criblage des gènes candidats

Puisque le phénotype est très similaire à l'UCMD et que ce dernier est causé par des mutations dans les gènes codant le collagène VI, nous supposons que le gène responsable de notre phénotype code pour une protéine impliquée dans l'ancrage de la fibre musculaire à la matrice extracellulaire. À ce moment, le gène qui nous semble le plus intéressant est l'intégrin alpha 9 (ITGA9). Faisant partie de la grande famille des intégrines, ce gène a pour fonction l'adhésion cellules-cellules et cellules-matrice. Ces intégrines agissent sous forme d'hétérodimère. ITGA9 a pour partenaire l'intégrine beta 1 (ITGB1)⁶³ tout comme un autre isoforme, l'intégrine alpha 7 (ITGA7). La protéine ITGA7 est connue pour être mutée dans une forme de myopathie congénitale⁵¹. Nous voulons effectuer diverses analyses afin d'inclure ou exclure ce gène candidat. De plus en plus de grandes délétions et insertions sont observés⁵⁷. C'est pourquoi l'absence de mutation lors du séquençage direct de l'ADN génomique n'est pas suffisante pour exclure un gène candidat. Nous avons accès à des tissus ainsi que des cellules en culture (myoblastes) pour trois de nos patients ce qui nous permet d'obtenir des échantillons d'ARN. Nous voulons séquencer la région codante de ce gène par RT-PCR. De cette façon, il sera possible d'identifier tous les types de mutations, ponctuelles, délétions ou insertions. Il sera aussi possible d'effectuer des Northern blot pour vérifier la présence et la taille de l'ARN chez nos individus. Un changement de taille viendrait corroborer l'hypothèse d'une délétion ou insertion. Dans le cas où l'on

soupçonnerait une duplication, un Southern blot avec des enzymes de restriction coupant fréquemment nous permettrait d'identifier ce type de changement. Dans ce cas, nous observerions une variation dans le patron de coupe des enzymes par rapport à un individu normal. Nous voulons aussi vérifier si la protéine est altérée. Pour ce faire, nous voulons effectuer des études d'immunohistochimie sur les tissus musculaires ainsi que des cellules en culture par immuno-buvarpage Western. En plus de nous donner des indications sur l'expression de la protéine, le Western blot peut nous informer sur le type de mutation. Dans le cas d'une protéine tronquée ou une grande délétion la protéine serait absente ou de taille plus petite. Dans le cas d'une insertion ou duplication, la protéine serait de taille plus grande que celle prédite. Ces analyses devraient être suffisantes afin d'établir si ITGA9 est bien le gène muté dans la CMDH. Dans le cas d'une exclusion, les mêmes analyses devront être complétées sur les autres gènes candidats.

5.2.2 Analyse de liaison pour d'autres populations au locus 3p23-21.3

Nous avons identifié un nouveau locus de CMD dans la population canadienne-française. Il est évident que ce nouveau locus permettra l'identification de nouveaux cas dans d'autres populations. Nous voulons tester ce nouveau locus sur une population du Canada anglais. Nous avons reçu des échantillons d'ADN provenant d'un groupe de Toronto. Pour ces cas, aucune exclusion génétique du collagène n'a encore été complétée, mais les études pathologiques ne démontrent aucune déficience évidente du collagène VI. Ces patients sont très

probablement liés à ce nouveau locus mais porteurs des mutations différentes de la cohorte canadienne-française. Comme la région du sud-ouest du Québec a principalement été peuplée par les Français au XVII et XVIII siècle, il serait intéressant de tester ce locus sur des cas français. Dans le cas où les mutations ont été introduites par des Français, il serait possible d'observer dans cette population les mêmes mutations qu'au Québec.

5.2.3 Identification d'un nouveau locus pour une CMD avec hyperlaxité

Nous avons identifié des familles atteintes d'une CMD avec hyperlaxité qui ne sont pas liées au locus sur le chromosome 3p23-21.3 (famille du Saguenay-Lac St-Jean décrit précédemment). Pour cette famille, la région du chromosome 3 a déjà été exclue, nous devons exclure les loci du collagène VI. Dans le cas où ces loci ont tous été exclus, nous voulons entreprendre un criblage entier du génome (GWS). Les deux enfants de cette famille sont affectés ce qui confère une bonne puissance d'analyse, mais avant d'effectuer un GWS nous devons recruter plus de familles de la région du Saguenay-Lac St-Jean. Si la puissance des familles envoyées au GWS est trop basse (en dessous de 1) le calcul de la valeur de LOD score donne trop de faux positifs et il devient difficile d'identifier le bon locus. Le recrutement de nouvelles familles ainsi qu'un GWS, nous permettra peut-être d'identifier un nouveau locus pour cette nouvelle forme de CMD avec hyperlaxité ligamentaire.

5.2.4 Hyperlaxité et retard moteur

Le fait que les parents porteurs obligatoires présentent un phénotype d'hyperlaxité sans atteinte musculaire nous a permis de formuler une nouvelle hypothèse. Nous croyons que les enfants démontrant une hyperlaxité des articulations combinées à un retard moteur pourrait être porteur d'une des mutations de la CMDH de manière dominante. Une fois les mutations identifiées, nous aimerions recruter des individus démontrant comme phénotype clinique de l'hyperlaxité, un retard moteur et aucune atteinte musculaire ou squelettique autre que l'hypertonie. Par séquençage génomique nous tenterions d'identifier des mutations dans le gène responsable de la CMDH. Cette hypothèse nous éclairerait peut-être sur les causes génétique de l'instabilité familiale des articulations et démontrerait que les causes génétiques d'une maladie rare peuvent parfois expliquer des phénomène ou traits plus communs.

References

1. Mercuri E, Yuva Y, Brown SC et al. Collagen VI involvement in Ullrich syndrome: a clinical, genetic, and immunohistochemical study. *Neurology*. 2002; 58:1354-1359
2. Mostacciuolo ML, Miorin M, Martinello F et al. Genetic epidemiology of congenital muscular dystrophy in a sample from north-east Italy. *Hum Genet*. 1996; 97:277-279

3. Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA et al. Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:809-823
4. Voit T. Congenital muscular dystrophies: 1997 update. *Brain Dev.* 1998; 20:65-74
5. Dubowitz V, Fardeau M. Proceedings of the 27th ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy. 22-24 April 1994, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 1995; 5:253-258
6. Dubowitz V. 41st ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy 8-10 March 1996, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 1996; 6:295-306
7. Lafuste P, Sonnet C, Chazaud B et al. ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol Biol Cell.* 2005; 16:861-870
8. Cormand B, Avela K, Pihko H et al. Assignment of the muscle-eye-brain disease gene to 1p32-p34 by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:126-135
9. Dubowitz V. Muscle disorders in childhood. *Major Probl Clin Pediatr.* 1978; 16:iii-282

10. Moghadaszadeh B, Desguerre I, Topaloglu H et al. Identification of a new locus for a peculiar form of congenital muscular dystrophy with early rigidity of the spine, on chromosome 1p35-36. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:1439-1445
11. Brockington M, Sewry CA, Herrmann R et al. Assignment of a form of congenital muscular dystrophy with secondary merosin deficiency to chromosome 1q42. *Am J Hum Genet.* 2000; 66:428-435
12. Dubowitz V. 68th ENMC international workshop (5th international workshop): On congenital muscular dystrophy, 9-11 April 1999, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 1999; 9:446-454
13. Mercuri E, Sewry CA, Brown SC et al. Congenital muscular dystrophy with secondary merosin deficiency and normal brain MRI: a novel entity? *Neuropediatrics.* 2000; 31:186-189
14. Philpot J, Sewry C, Pennock J et al. Clinical phenotype in congenital muscular dystrophy: correlation with expression of merosin in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord.* 1995; 5:301-305
15. Vainzof M, Marie SK, Reed UC et al. Deficiency of merosin (laminin M or alpha 2) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropediatrics.* 1995; 26:293-297

16. Fardeau M, Tome FM, Helbling-Leclerc A et al. (Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency: clinical, histopathological, immunocytochemical and genetic analysis). *Rev Neurol (Paris)*. 1996; 152:11-19
17. Herrmann R, Straub V, Meyer K et al. Congenital muscular dystrophy with laminin alpha 2 chain deficiency: identification of a new intermediate phenotype and correlation of clinical findings to muscle immunohistochemistry. *Eur J Pediatr*. 1996; 155:968-976
18. Arancio O, Bongiovanni LG, Bonadonna G et al. Congenital muscular dystrophy and cerebellar vermis agenesis in two brothers. *Ital J Neurol Sci*. 1988; 9:485-489
19. Camacho VO, Bertini E, Zhang RZ et al. Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:7516-7521
20. Muntoni F, Bertini E, Bonnemann C et al. 98th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD), 7th Workshop of the International Consortium on CMD, 2nd Workshop of the MYO CLUSTER project GENRE. 26-28th October, 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2002; 12:889-896

21. Demir E, Sabatelli P, Allamand V et al. Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2002; 70:1446-1458
22. Higuchi I, Suehara M, Iwaki H et al. Collagen VI deficiency in Ullrich's disease. *Ann Neurol.* 2001; 49:544
23. Lampe AK, Bushby KM. Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet.* 2005; 42:673-685
24. Mercuri E, Longman C. Congenital muscular dystrophy. *Pediatr Ann.* 2005; 34:560-568
25. Pan TC, Zhang RZ, Sudano DG et al. New molecular mechanism for Ullrich congenital muscular dystrophy: a heterozygous in-frame deletion in the COL6A1 gene causes a severe phenotype. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:355-369
26. Mercuri E, Lampe A, Straub V et al. Congenital muscular dystrophy with short stature, proximal contractures and distal laxity. *Neuropediatrics.* 2004; 35:224-229
27. Lamande SR, Shields KA, Kornberg AJ et al. Bethlem myopathy and engineered collagen VI triple helical deletions prevent intracellular multimer assembly and protein secretion. *J Biol Chem.* 1999; 274:21817-21822

28. Kirschner J, Hausser I, Zou Y et al. Ullrich congenital muscular dystrophy: connective tissue abnormalities in the skin support overlap with Ehlers-Danlos syndromes. *Am J Med Genet A*. 2005; 132:296-301
29. Dietz HC, Pyeritz RE, Hall BD et al. The Marfan syndrome locus: confirmation of assignment to chromosome 15 and identification of tightly linked markers at 15q15-q21.3. *Genomics*. 1991; 9:355-361
30. Lee B, Godfrey M, Vitale E et al. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature*. 1991; 352:330-334
31. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*. 1986; 103:2499-2509
32. Boileau C, Jondeau G, Babron MC et al. Autosomal dominant Marfan-like connective-tissue disorder with aortic dilation and skeletal anomalies not linked to the fibrillin genes. *Am J Hum Genet*. 1993; 53:46-54
33. Collod G, Babron MC, Jondeau G et al. A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. *Nat Genet*. 1994; 8:264-268
34. Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet*. 2004; 36:855-860

35. Beighton P, De PA, Steinmann B et al. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet.* 1998; 77:31-37
36. Narcisi P, Richards AJ, Ferguson SD et al. A family with Ehlers-Danlos syndrome type III/articular hypermobility syndrome has a glycine 637 to serine substitution in type III collagen. *Hum Mol Genet.* 1994; 3:1617-1620
37. Zweers MC, Bristow J, Steijlen PM et al. Haploinsufficiency of *TNXB* is associated with hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:214-217
38. Tetreault M, Duquette A., Thiffault I., Bherer C., Jarry J., Loisel L., Banwell B., D'Anjou G, Mathieu J., Robitaille Y., Karpati G., Vanasse M., and Brais B. A New Congenital Muscular Dystrophy with hyperlaxity maps to 3p23-21.3. 2006.
Ref Type: Generic
39. Lehrman MA, Russell DW, Goldstein JL et al. Alu-Alu recombination deletes splice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1987; 262:3354-3361

40. Ishikawa H, Sugie K, Murayama K et al. Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology*. 2004; 62:620-623
41. Freitas RT, Zanoteli E, Morita MP et al. (Analysis of the expression of collagen VI in congenital muscular dystrophy.). *Arq Neuropsiquiatr*. 2005; 63:514-518
42. Iwawake-Hirasawa E, Le AH, Nishino I et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet*. 2002; 70:1368-1375
43. Mariyama M, Zheng K, Yang-Feng TL et al. Colocalization of the genes for the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) chains of type IV collagen to chromosome 2 bands q35-q37. *Genomics*. 1992; 13:809-813
44. Tsonis PA, Goetinck PF. The *Drosophila* homoeotic gene *spalt* is structurally related to collagen alpha 1(IV) chain. *Coll Relat Res*. 1988; 8:451-452
45. Gould DB, Phalan FC, Breedveld GJ et al. Mutations in *Col4a1* cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science*. 2005; 308:1167-1171
46. Lemmink HH, Mochizuki T, van den Heuvel LP et al. Mutations in the type IV collagen alpha 3 (*COL4A3*) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet*. 1994; 3:1269-1273

47. Lemmink HH, Schroder CH, Monnens LA et al. The clinical spectrum of type IV collagen mutations. *Hum Mutat.* 1997; 9:477-499
48. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ et al. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* 1992; 355:696-702
49. Matsumura K, Tome FM, Collin H et al. Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature.* 1992; 359:320-322
50. Douville P, Seldin MF, Carbonetto S. Genetic mapping of the integrin alpha 1 gene (Vla1) to mouse chromosome 13. *Genomics.* 1992; 14:503-505
51. Hayashi YK, Chou FL, Engvall E et al. Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet.* 1998; 19:94-97
52. Danielson KG, Fazio A, Cohen I et al. The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics.* 1993; 15:146-160
53. Schollin J, Bjarke B, Gustavson KH. Probable homozygotic form of the Marfan syndrome in a newborn child. *Acta Paediatr Scand.* 1988; 77:452-456

54. Ahmad NN, Dimascio J, Knowlton RG et al. Stickler syndrome. A mutation in the nonhelical 3' end of type II procollagen gene. Arch Ophthalmol. 1995; 113:1454-1457
55. Baker NL, Morgelin M, Peat R et al. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2005; 14:279-293
56. Dubowitz V. 50th ENMC International Workshop: congenital muscular dystrophy. 28 February 1997 to 2 March 1997, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul Disord. 1997; 7:539-547
57. Pepe G, Lucarini L, Zhang RZ et al. COL6A1 genomic deletions in Bethlem myopathy and Ullrich muscular dystrophy. Ann Neurol. 2005;
58. Zhang RZ, Sabatelli P, Pan TC et al. Effects on collagen VI mRNA stability and microfibrillar assembly of three COL6A2 mutations in two families with Ullrich congenital muscular dystrophy. J Biol Chem. 2002; 277:43557-43564
59. Duquette A, Roddier K, Nabb-Baltar J et al. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. Ann Neurol. 2005; 57:408-414

60. Roddier K, Thomas T, Marleau G et al. Two mutations in the HSN2 gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians. *Neurology*. 2005; 64:1762-1767
61. Laberge AM, Michaud J, Richter A et al. Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet*. 2005; 68:287-301
62. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992; 69:11-25
63. Palmer EL, Ruegg C, Ferrando R et al. Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle. *J Cell Biol*. 1993; 123:1289-1297
64. Mayer U, Saher G, Fassler R et al. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1997; 17:318-323
65. Allamand V, Sunada Y, Salih MA et al. Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. *Hum Mol Genet*. 1997; 6:747-752
66. Coral-Vazquez RM, Rosas-Vargas H, Meza-Espinosa P et al. Severe congenital muscular dystrophy in a Mexican family with a new nonsense mutation (R2578X) in the laminin alpha-2 gene. *J Hum Genet*. 2003; 48:91-95

67. Gehlsen KR, Dillner L, Engvall E et al. The human laminin receptor is a member of the integrin family of cell adhesion receptors. *Science*. 1988; 241:1228-1229
68. Dietz HC, Loeys B, Carta L et al. Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005; 139:4-9
69. De BM, Giasson F, Mathieu J et al. Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec. *Genet Epidemiol*. 1993; 10:17-25
70. Daigneault J, Aubin G, Simard F et al. Incidence of cystic fibrosis in Saguenay-Lac-St.-Jean (Quebec, Canada). *Hum Biol*. 1992; 64:115-119
71. Morin C, Mitchell G, Larochelle J et al. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet*. 1993; 53:488-496
72. Kibar Z, Dube MP, Powell J et al. Clouston hidrotic ectodermal dysplasia (HED): genetic homogeneity, presence of a founder effect in the French Canadian population and fine genetic mapping. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8:372-380

73. Camacho JA, Obie C, Biery B et al. Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet.* 1999; 22:151-158
74. Laberge AM, Jomphe M, Houde L et al. A "Fille du Roy" introduced the T14484C Leber hereditary optic neuropathy mutation in French Canadians. *Am J Hum Genet.* 2005; 77:313-317

Annexe 1: LOD score

Plusieurs méthodes d'analyses sont disponibles pour évaluer l'hypothèse d'une liaison génétique : les méthodes paramétriques, les méthodes paramétriques indépendantes du modèle génétique et les méthodes non paramétriques. Dans une étude de maladies monogénique, comme celle présente dans cette thèse, c'est les méthodes paramétriques qui sont utilisées. Celle utilisée le plus fréquemment, est le calcul de LOD score (Morton et al. 1955). Le LOD score est le logarithme décimal du rapport de la vraisemblance de la non liaison. Le seuil de décision est fixé à -2 pour une exclusion et à +3 pour une liaison avec la maladie. Un LOD score de 3 signifie que la probabilité que la liaison génétique existe est 999 fois supérieure à la probabilité d'une non liaison. Nous avons utilisé dans cette étude le calcul de LOD score de type séquentiel. La valeur de LOD est calculée pour chacune des familles de la cohorte et le LOD score total de la cohorte est obtenu par la somme des LOD score de chaque famille (Wald et al. 1977).

Morton N.E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am J. Hum Genet* **7**(3): 277-318

Wald A. (1977). Sequential analysis. New York. John Wiley & Sons.

Annexe 2 : Calculs du LOD en deux points

L'analyse de liaison entre un marqueur et la maladie se nomme méthode deux points. Cet algorithme de type d'Elston-Stewart considère un marqueur microsatellite par rapport au statut de l'individu (Gudbjartsson et al. 2000). C'est-à-dire qu'il compare chaque marqueur, un à la fois, avec le statut affecté, sans tenir compte des marqueurs environnant et la distance entre ceux-ci. Afin de couvrir une grande distance et de bien évaluer la taille de l'intervalle candidat il est nécessaire de tester un grand nombre de marqueurs avec une bonne densité. Plusieurs logiciels existent pour ce type de calcul : Linkage, Fastlink, Vitesse. Dans cette étude, nous avons utilisé le programme MLINK de Linkage.

Gudbjartsson D.F., Jonasson K., Frigge M.L. and Kong A. (2000). Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* **25**(1): 12-13

Annexe 3 : Calculs du LOD en multipoint

Une autre méthode pour effectuer un calcul de LOD score, est la méthode d'analyse en multipoint. L'analyse en multipoint est plus précise qu'en deux points et tient compte des principes fondamentaux de génétique. Les recombinaisons homologues survenant lors des méioses entre deux loci se produisent à une fréquence proportionnelle à la distance les séparant. Donc, plus la distance est petite plus il risque d'avoir co-ségrégation. La méthode de calcul des LOD scores en multipoint compare un marqueur par rapport au statut affecté en tenant compte des résultats pour les marqueurs environnant et de la distance entre ceux-ci. Donc, plus les marqueurs sont proches, plus nous avons de chance qu'ils aient été transmis en bloc. En connaissant la distance entre les marqueurs, le logiciel tente d'évaluer si les marqueurs co-ségrégent plus souvent qu'il est statistiquement prédit. De plus, cet algorithme calcul des valeurs de LOD pour des points fictifs entre deux marqueurs permettant de mieux évaluer la taille de l'intervalle candidat. Plusieurs logiciels peuvent faire ce type d'analyse, Genhunter, Merlin, Allegro. Dans cette étude nous avons utilisé Genhunter.

Annexe 4 : Autorisation des co-auteurs

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

A new form of muscular dystrophy
with joint hyperlaxity maps to
3p23 - 21.

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below

[Redacted signature area]

Yours sincerely, ANTOINE DUQUETTE

co author.

Date: 04/01/06

Declaration form which must be submitted by all authors for subraission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

A New congenital muscular dystrophy with

joint hyperextensibility maps to 3p23.213

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors

[Redacted signature area]

05-01-09

Yours sincerely

co author.

B. Baralle

Date:

January 5, 2006

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

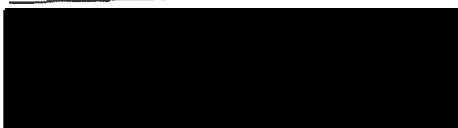
congenital muscular atrophy with joint
hyperflexity maps to 3p23.21

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors



Yours sincerely

co author. George Koppa

Date: January 10, 2006

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

A new congenital muscular dystrophy
with joint hyperlaxity maps to 3p23-24

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors



G. DANJON

Yours sincerely

co author.

Date: ~~05~~ Jan 17th, 2006

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

A NEW FORM OF CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY

WITH JOINT HYPERLAKITY MAPS to 3p23-21

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors

Yours sincerely

co author

Date:

Jan 16th, 2006

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled:

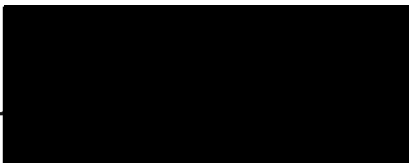
A NEW CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY
WITH JOINT HYPERLAXITY MAPS TO 3p23-21.

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors



Yours sincerely

co author. JONATHAN JARRY

Date: JAN. 4 2006

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN

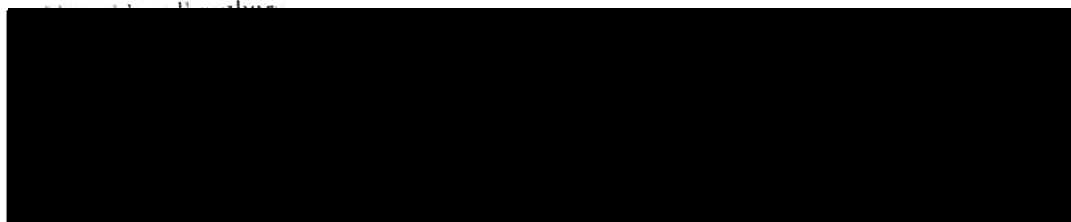
We/I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

A new form of organized molecular computing with
gene hyperactivity maps to Sp23.21

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below



Yours sincerely

co author: Martine Tchernin, Isabelle Thiffeau IT, and Louis,
Claude Excoffier

Date: 04-01-06

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We/I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

A NEW CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY
WITH JOINT HYPERLAXITY MAPS TO 3P23-21

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors

[Redacted signature]

MICHEL VANASSE

Yours sincerely

Michel Vanasse
co author.

Date:

Jan 11 2006

Declaration form which must be submitted by all authors for submission to BRAIN.

We / I would be very grateful if you would consider the following paper entitled

for publication as an original article in Brain.

I certify that all authors have read and approved the final version of the manuscript.
There are no financial interests of any author of this paper.

The declaration of all authors that the work reported in the paper has not been and is not
intended to be published anywhere except in Brain is below

Signed by all authors

Yours sincerely

YVES REBETILLE MD.
co author.

Y. Rebette

Date: 06/01/10